

Synthese und Evaluation fluoreszenter Sonden für nichtinvasive Diagnose- verfahren der Alzheimer-Demenz



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte
kumulative Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Alexander Boländer
aus Darmstadt


Referent: Prof. Dr. Boris Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Tag der Einreichung: 26. Juni 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 2012

Darmstadt 2012



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt seit Januar 2008 angefertigt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Boris Schmidt* für die Betreuung meiner Arbeit danken, bei deren Anfertigung ich mich mit einem derart breiten Spektrum medizinalchemischer Forschung befassen durfte. Sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das sich in unzähligen Diskussionen und wertvollen Anregungen geäußert hat, war eine besondere Motivation.

Mit *Daniel Kieser* hatte ich das Glück, an den besten Laborkollegen zu geraten, den ich mir vorstellen kann und dem ich hiermit für unsere gute Teamarbeit sowohl im Labor als auch darüber hinaus danken möchte.

Ein großer Dank geht auch an meine Kollegin *Andrea Zall* für ihre Hilfsbereitschaft, ihren Humor und ihren unerschütterlichen Optimismus.

Allen aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises, *Azadeh Nazari, Binia Drung, Constantin Voss, Eva Naumann, Fabio LoMonte, Jiamin Gu, Marlyse Okala, Stefan Göring, Thomas Kramer* und *Upendra Anumala* danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und für die vielen kurzweiligen Stunden zu den vielfältigsten Gelegenheiten.

Besonders danke ich *Andrea* und *Eva* für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit.

Auch danke ich allen meinen Studenten, die mit mir und auch für mich gearbeitet haben. Dabei geht ein besonderer Dank an *Rüdiger Wittmann, Barbara Pfadler, Christoph Scholz* und *Silvia Bauer*.

Unserer Sekretärin *Birgit Keenan* danke ich dafür, dass sie als gute Seele des Arbeitskreises für einen reibungslosen Ablauf aller organisatorischen Belange sorgt.

Dr. Roland Heyny-von Haußen danke ich für seine grenzenlose Geduld bei unzähligen Stunden vor dem Fluoreszenzmikroskop und für eine wunderbare Zusammenarbeit.

Allen Kollegen im Verbundprojekt MINDE danke ich für eine sehr interessante und interdisziplinäre Kooperation, ganz besonders *Jana Hölzer* und *Christian Schön*.

Allen Mitarbeitern des *Clemens Schöpf-Instituts* möchte ich für ihre Arbeit danken. Im Speziellen bedanke ich mich bei *Frau Rudolph* für die Aufnahme ungezählter Massenspektren.

Gar nicht genug danken kann ich meiner Familie und dabei besonders meinen Eltern für grenzenlosen Rückhalt in allen Lebenslagen, für ihren Zuspruch und für ihr Vertrauen.

Vielen herzlichen Dank dafür!

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht

- Fabio LoMonte, Thomas Kramer, Alexander Boländer, Batya Plotkin, Hagit Eldar-Finkelman, Ana Fuertes, Juan Dominguez und Boris Schmidt, “*Synthesis and biological evaluation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: A fast and atom efficient access to 1-aryl-3-benzylureas*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 5610-5615.
- Loretta Belfiore, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Daniel Kieser, Alexander Boländer und Boris Schmidt, „*Präparation der menschlichen Nasenschleimhaut am Institut für Pathologie am Klinikum Darmstadt*“, wurde im November **2011** bei *Der Präparator* zur Veröffentlichung eingereicht.
- Boris Schmidt, Daniel Kieser, Roland Heyny-von Haußen, Jochen Herms, Alexander Boländer, „*Compounds for the diagnosis of neurodegenerative disorders on the olfactory epithelium*“, internationale Patentanmeldung am 29. März **2012**, **WO2012/037928 A2**.
- Boris Schmidt, Daniel Kieser, Roland Heyny-von Haußen, Jochen Herms, Alexander Boländer, „*Compounds for diagnosing neurodegenerative diseases at the retina*“, internationale Patentanmeldung am 05. April **2012**, **WO2012/041292 A2**.
- Alexander Boländer, Daniel Kieser, Constantin Voss, Silvia Bauer, Christian Schön, Steffen Burgold, Tobias Bittner, Jana Hölzer, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech, Henner Knust, Robert Berger, Jochen Herms, Ingrid Hilger und Boris Schmidt, „*Bis(arylviny)pyrazines, -pyrimidines and -pyridazines as Imaging Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models*“, wurde im Mai **2012** bei *Journal of Medicinal Chemistry* zur Veröffentlichung eingereicht.
- Alexander Boländer, Rüdiger Wittmann, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech und Boris Schmidt, „*Synthesis and histological evaluation of substituted urea derivatives and carboxamides in Alzheimer's Disease*“, wird im Juni **2012** bei *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* zur Veröffentlichung eingereicht.

-
- Alexander Boländer, Daniel Kieser, Christoph Scholz, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech und Boris Schmidt, „*Synthesis of Methoxy-XO4 Derivatives and their Evaluation in Alzheimer’s Disease Models*“, wird im Juni **2012** bei *Neurodegenerative Diseases* zur Veröffentlichung eingereicht.

Posterbeiträge

- Boris Schmidt, Alexander Boländer, Stefanie Baumann, Daniel Kieser, Ali Taghavi, Roland Heyny-von Haußen, „*Phenylthiazolhydrazides-A Lead For Tau Aggregation Inhibitors and Tau-Imaging?*“, ICAD meeting, 11.-16. Juli **2009**, Chicago.
- Daniel Kieser, Alexander Boländer, Christian Schön, Dr. Tobias Bittner, Roland Heyny-von Haußen, Jochen Herms, Boris Schmidt, „*Alzheimer in vivo diagnostic with high fluorescent dyes*“, Biophotonik, 23.-24. September **2010** Ulm.
- Alexander Boländer, „*Alzheimer in vivo diagnosis with highly fluorescent dyes*“, Kurzvortrag und Posterpräsentation für das Promotionskolleg der TU Darmstadt, 15. Dezember **2010**, Darmstadt.
- Fabio Lo Monte, Thomas Kramer, Alexander Boländer, Batya Plotkin, Hagit Elgar-Finkelman, „*GSK-3 Inhibitors in Alzheimer's Disease*“ (P2-535), AAIC, 16.-21. Juli **2011**, Paris.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
AS	Aminosäure
A β	Amyloid- β -Peptid
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
AcOH	Essigsäure
AD	Alzheimer'sche Krankheit (Alzheimer's disease)
AICD	cytoplasmatische Domäne
Äq	Äquivalent
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
Ar	Aromat
BACE	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>blood-brain-barrier</i>)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSc	Boris Schmidt-Substanzdatenbank-Eintragsnummer
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
Cy	Cyclohexan
COX	Cyclooxygenase
CSF	Rückenmarksflüssigkeit (<i>cerebrospinal fluid</i>)
CT	Computertomographie
d	Dublett
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan

DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIPEA	Diisopropyletylamin
DIPA	Diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
dpf	Tage nach Befruchtung (<i>days post fertilization</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoßionisation
Em.	Emission
EOAD	<i>early onset Alzheimer's disease</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
GSM	γ -Sekretase Modulator
Hex	Hexan
hpf	Stunden nach Befruchtung (<i>hours post fertilization</i>)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors, welche die halbe Aktivität des Enzyms bewirkt
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LC	<i>liquid chromatography</i>
LOAD	<i>late onset Alzheimer's disease</i>
log <i>P</i>	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
m	Multiplett
M ⁺	Molekül-Kation
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute

MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NBS	N-Bromsuccinimid
Nct	Nicestrin
NFT	neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangle</i>)
NGF	Nervenzustumfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSAID	nichtsteroidaler Entzündungshemmer (<i>non steroidal anti inflammatory drug</i>)
Pen-2	Presenilin enhancer-2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	gepaarte helikale Filamente (<i>paired helical filaments</i>)
PS	Presenilin
PSP	progressive supranukleäre Blickparese
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (<i>Single-photon emission computed tomography</i>)
t	Triplett
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Tetramethylsilan
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
Ub	Ubiquitin
ZNS	Zentralnervensystem
δ	chemische Verschiebung

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	3
1.1. DIE ALZHEIMER'SCHE KRANKHEIT	3
1.2. PATHOLOGIE	3
1.3. MOLEKULARE GRUNDLAGEN	5
1.3.1. AMYLOID B UND DIE AMYLOIDHYPOTHESE ZUR ENTSTEHUNG VON AD	5
1.3.2. NEUROFIBRILLEN UND DIE TAU-HYPOTHESE ZUR ENTSTEHUNG VON AD	11
1.3.3. DIE GLYKOGEN-SYNTHEASE-KINASE 3	14
1.4. THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEHANDLUNG VON AD	16
1.4.1. AB-GERICHTE THERAPIEN DER AD	17
1.4.2. TAU-GERICHTE THERAPIEN DER AD	20
1.5. BILDGEBENDE VERFAHRENSTECHNIKEN ZUR DIAGNOSE VON AD	22
1.6. FLUORESCENTE SONDEN FÜR DIE ALZHEIMER-DIAGNOSTIK	30
1.7. NEUARTIGE DIAGNOSEVERFAHREN	33
1.7.1. DAS RIECHEPITHEL	33
1.7.2. DIE RETINA	36
2. ZIELSETZUNG	40
3. ALLGEMEINER UND KUMULATIVER TEIL	42
3.1. FLUORESCENTE SONDEN FÜR DIE DIAGNOSTIK VON MORBUS ALZHEIMER	42
3.1.1. STRATEGIEN FÜR DIE ENTWICKLUNG NEUER FLUORESZENTER SONDEN	42
3.1.2. BIS(ARYLVINYL)PYRAZINE, -PYRIMIDINE -UND PYRIDAZINE ALS IMAGING-SUBSTANZEN FÜR TAU-FIBRILLEN UND AMYLOIDE PLAQUES IN MODELLEN DER ALZHEIMER-DEMENTZ	43
3.1.3. SYNTHES UND HISTOLOGISCHE EVALUATION VON SUBSTITUIERTEN HARNSTOFFDERIVATEN UND CARBOXAMIDEN FÜR DIE ALZHEIMER'SCHE KRANKHEIT	107
3.1.4. SYNTHES VON DERIVATEN DES FLUORESCENZMARKERS METHOXY-XO4 UND IHRE EVALUATION IN MODELLEN DER ALZHEIMER-DEMENTZ	129
3.1.5. FLUORESCENTE RETINASONDEN FÜR DIE DIAGNOSTIK DER ALZHEIMER'SCHEN KRANKHEIT	146
3.1.6. FLUORESCENTE SONDEN FÜR DIE DIAGNOSTIK NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN AM RIECHEPITHEL	172
3.1.7. ENTWICKLUNG EINER NEUEN PRÄPARATIONSMETHODE ZU ENTNAHME UND HISTOLOGISCHER UNTERSUCHUNG MENSCHLICHER NASENSCHLEIMHAUT	195
3.1.8. SYNTHES VON INHIBITOREN DER GLYKOGEN-SYNTHEASE-KINASE 3B	201
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	246
5. EXPERIMENTELLER TEIL NICHT PUBLIZIERTER SUBSTANZEN	252
6. LITERATURVERZEICHNIS	260
7. ANHANG	266



1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer'sche Krankheit

Die Alzheimer'sche Krankheit (AD) ist die häufigste Form irreversibler Demenzerkrankungen. Die geschätzte Zahl der Betroffenen liegt in Europa bei 7-8 Millionen, in den USA bei 4-5 Millionen und weltweit bei 24 Millionen.^[1] In der Mehrzahl der Fälle bricht die Krankheit in höherem Alter aus. Nach einer willkürlich gezogenen Altersgrenze werden Patienten, die älter als 65 Jahre sind, als *late onset* AD (LOAD)-Fälle klassifiziert. In selteneren Fällen kann sie auch in jungen Jahren auftreten, solche Patienten werden als *early onset* Fälle der AD (EOAD) bezeichnet. Angesichts des sich vor allem in den Industrieländern vollziehenden demographischen Wandels ist bis zum Jahre 2020 weltweit mit einem Anstieg auf 42 Millionen Erkrankte zu rechnen.^[2]

Zu Beginn machen sich erste Anzeichen von AD in alltäglichen Situationen bemerkbar. Betroffene erscheinen zeitweise in ihrem Wesen verändert, leiden an leichten depressiven Verstimmungen oder sind nicht mehr in der Lage, Informationen des Alltagsgeschehens richtig einzuordnen.^[3] Solche Zustände vorübergehender Verwirrtheit werden beim Fortschreiten der Krankheit immer häufiger. Dabei wissen die Betroffenen lange Zeit immer noch genau, wer sie sind oder woher sie stammen und können detailliert Auskunft über Erlebtes aus ihrer Vergangenheit geben. Das semantische und prozedurale Gedächtnis bleibt am längsten unversehrt, nur die Aufnahme neuerer Informationen und deren Übertragung in das Langzeitgedächtnis bereitet zunächst Schwierigkeiten. Dies ist auf eine anfängliche Störung bei der Verarbeitung von Sinneseindrücken im Neocortex in Zusammenspiel mit entorhinaler Region und Hippocampus zurückzuführen.^[4] Beim Fortschreiten der Krankheit weiten sich die Schädigungen auf weitere Teile des Gehirns aus, die sich in zunehmenden kognitiven Störungen wie Gedächtnisverlust, schweren Depressionen, mangelndem Urteilsvermögen und stetig zunehmender Verwirrtheit bemerkbar machen. Die Krankheit endet mit einem vollständigen Verlust des Verstandes schließlich tödlich, da auch neuronale Abläufe, die für lebenswichtige Vitalfunktionen entscheidend sind, versagen.^[5]

1.2. Pathologie

Vom Auftreten erster Symptome geistiger Beeinträchtigung bis zum Tod vergehen durchschnittlich 8 Jahre.^[6] Den kurzzeitigen Störungen im Anfangsstadium der Krankheit liegen bereits schwerwiegende krankhafte Veränderungen im Gehirn der Patienten zugrunde.^[7] Dies wird bei magnetresonanztomographischen Untersuchungen deutlich, mit denen eine Volumenabnahme der grauen Substanz nachweisbar ist, die eine normale

altersbedingte Abnahme von Hirnmasse deutlich überschreitet.^[8] Diese krankhafte Volumenabnahme ist auf das Verkümmern und Absterben von Nervenzellen zurückzuführen. Trotz großer Forschungsfortschritte in den letzten Jahren bleibt die genaue Ursache dafür unbekannt. Bei histologischen Untersuchungen von durch die Krankheit geschädigtem Hirngewebe stellte bereits der Pionier und Namensgeber dieses „eigenartigen Krankheitsprozesses“ Alois Alzheimer 1906 im Rahmen seiner Studien zwei Arten von pathologischen Veränderungen fest und machte diese „eigenartigen kleinen Herde“ für die Zerstörung der Nervenzellen verantwortlich:^[9] Innerhalb der Nervenzellen erkannte er fibrilläre Aggregate und konnte auch extrazelluläre Ablagerungen einer „pathologischen metabolischen Substanz“ erkennen, die er aufgrund ihrer stärkeartigen Morphologie als „Amyloid“ beschrieb. Auch heute gelten Neurofibrillen und Amyloidablagerungen als pathologische Kennzeichen von AD, die nach wie vor nur im Rahmen einer Obduktion des verstorbenen Patienten sicher nachweisbar sind (Abbildung 1).

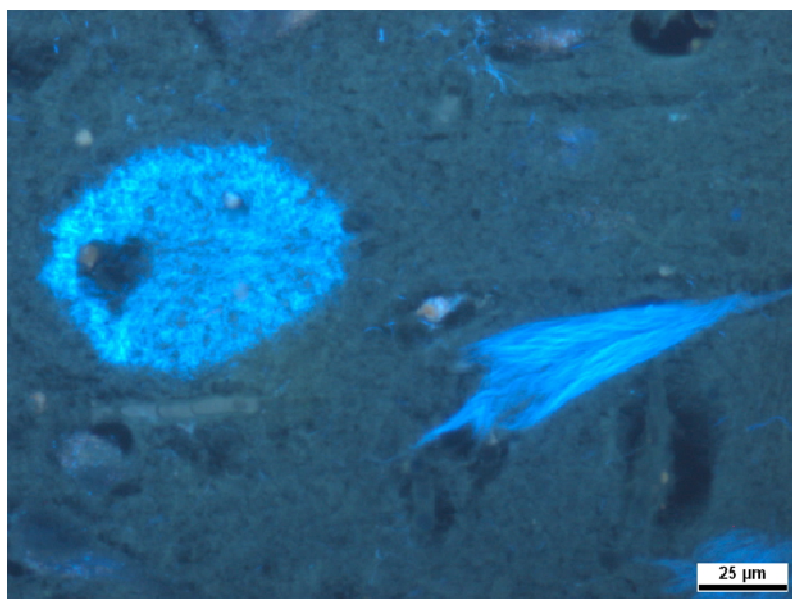


Abbildung 1: Histochemische Färbung eines Amyloidplaques (links) und einer Neurofibrille (rechts) auf humanem Ammonshorngewebe (Färbung mit **6d** aus Kapitel 3.1.2, Filter-Set 02 G365, FT395, LP420).

Sie werden bei den meisten Erklärungsversuchen als Ursache für die Zerstörung von Hirngewebe angesehen. Anhand der Häufigkeit und Ausbreitung von Neurofibrillen und Amyloidablagerungen werden sechs „Braak-Stadien“ zur Quantifizierung der Cortexdegeneration herangezogen.^[10] Dabei wird deutlich, dass beide Arten von Proteinablagerungen hinsichtlich ihrer lokalen Anhäufung offensichtlich unabhängig voneinander in Erscheinung treten, wobei erste Amyloidablagerungen stets im Neocortex

auftreten und sich schließlich über die entorhinale Region, den mittleren Schläfenlappen und Hippocampus, sowie Vorder- und Kleinhirn ausbreiten.^[11] Für Neurofibrillen konnte eine solche Beobachtung bisher nicht gemacht werden. Beide Arten von pathophysiologischen Veränderungen können aber bereits viele Jahre, oft sogar Jahrzehnte vor ersten klinischen Demenzsymptomen auftreten und eine signifikante Schädigung von Nervenzellen verursachen. Diese zunehmende neuronale Atrophie kann zunächst bis zu einem gewissen Grad von der kognitiven Reservekapazität des Gehirns kompensiert werden. Erst bei einer Schädigung von 40-50% der Synapsen wird ein Patient klinisch auffällig.^[12] Trotz dieser relativ langen Dauer des präklinischen asymptomatischen Stadiums der Krankheit basieren aktuelle Diagnosekriterien für AD auf Demenzsymptomen. Das bedeutet aber, dass Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium die Diagnosekriterien für AD erfüllen, da die Krankheit zunächst nach dem ICD-10 (*International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems, 10th revision*)-Standardtest diagnostiziert wird. Dabei handelt es sich um einen psychologischen Test, der mehrere höhere Geistesfunktionen anspricht.^[13] Dieser Test ist für eine konkrete Diagnostizierung jedoch unzureichend, da die Pathogene unberücksichtigt bleiben. Ob weiterführende diagnostische Methoden herangezogen werden, hängt von den Ergebnissen dieser Tests ab.

1.3. Molekulare Grundlagen

Im folgenden Abschnitt wird die Entstehung der beiden AD-charakteristischen Proteinaggregate, amyloiden Plaques und Neurofibrillen, beschrieben. Da bisher nicht sicher nachgewiesen werden konnte, dass diese zwei Pathologien miteinander in Zusammenhang stehen, bilden beide Aggregate jeweils die Grundlage zweier unterschiedlicher Hypothesen zur Entstehung von AD, die durch verschiedene Befunde gestützt werden.

1.3.1. Amyloid β und die Amyloidhypothese zur Entstehung von AD

Die extrazellulären plaqueartigen Amyloidablagerungen bestehen aus Aggregaten von fibrillären A β -Peptiden. Diese entstehen infolge zweier aufeinanderfolgender enzymatischer Spaltungen des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP), einem Typ-1-Membranprotein von unbekannter physiologischer Funktion, das am häufigsten im Zentralnervensystem exprimiert wird.^[14] Wie andere Membranproteine wird APP am endoplasmatischen Reticulum synthetisiert, dann zum Golgi-Apparat und über das Trans-Golgi-Netzwerk weiter zur Zelloberfläche transportiert, wo es reinternalisiert wird.^[15] Den größten Teil von APP macht seine extrazelluläre Domäne aus, weiterhin besitzt es eine transmembrane und eine cytoplasmatische Domäne. Die enzymatische Prozessierung von

APP erfolgt an der extrazellulären Domäne durch drei Transmembranproteasen, die α , β , und γ -Sekretase (Abbildung 2).

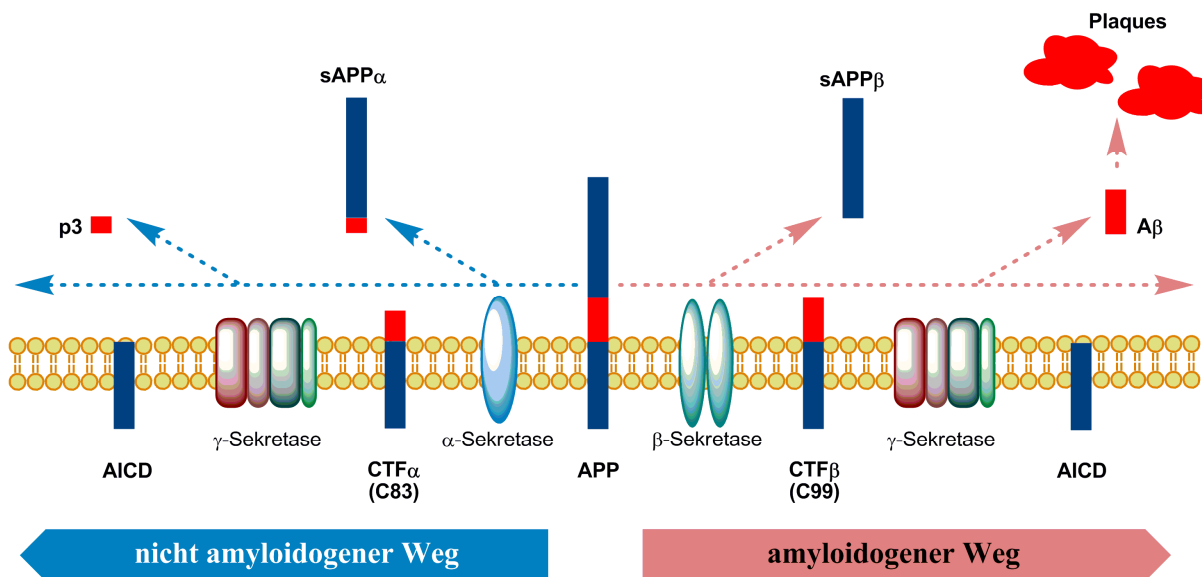


Abbildung 2: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP nach dem amyloidogenen (rechts) und nichtamyloidogenen Weg (links).^[16]

Sowohl die α - als auch die β -Sekretase spalten APP nahe der Transmembrandomäne, wodurch die extrazelluläre Domäne des Proteins abgetrennt und in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Das durch die α -Sekretase abgespaltene Fragment wird als sAPP α , das durch die β -Sekretase (auch BACE1, Asp2 oder Memapsin2 genannt) abgespaltene als sAPP β bezeichnet. In beiden Fällen verbleibt ein kurzes C-terminales Fragment (CTF) an der Transmembrandomäne. Dieses ist infolge der Spaltung durch die α -Sekretase 83 Aminosäuren (CTF α), infolge der Spaltung durch die β -Sekretase 99 Aminosäuren lang (CTF β).^[17]

Beide CTFs sind Substrate der γ -Sekretase: Aus der Spaltung von CTF α resultiert das in der Membran verbleibende Fragment APP intracellular domain (AICD) und das kürzere p3-Peptid, welches als pathologisch harmlos gilt und im Extrazellulärraum abgebaut wird. Durch die proteolytische Spaltung von CTF β entsteht ebenfalls AICD, jedoch auch das A β -Peptid, wobei darunter eine Gruppe von Peptiden unterschiedlicher Länge an ihrem C-Terminus zu verstehen ist, da die Substratspaltung der γ -Sekretase an verschiedenen benachbarten Positionen stattfindet: Diese Proteolyseprodukte, die in den Extrazellulärraum freigesetzt werden, sind A β_{40} (zu 80-90%), A β_{42} (zu 5-10%) sowie kürzere Peptide wie A β_{37} und A β_{38} . Besonders A β_{42} besitzt eine hohe Aggregationstendenz und initiiert die Bildung fibrillärer β -

Faltblattstrukturen, die auch A β ₄₀ binden können und schließlich makroskopische Amyloidplaques bilden.^[18]

Der durch die β -Sekretase initiierte Metabolismus von APP wird auch amyloidogener Weg der APP-Prozessierung genannt. Der Anteil von APP, der durch die α - oder β -Sekretase gespalten wird, variiert und hängt wahrscheinlich von der β -Sekretaseaktivität der jeweiligen Zelle ab, wobei auch die Aktivierung bestimmter Rezeptoren die Prozessierung von APP in Richtung des amyloidogenen Wegs verschiebt.^[19]

Ein krankhaft gesteigerter APP-Metabolismus nach dem amyloidogenen Weg wird gemäß der Amyloidhypothese als Ursache für die Entstehung von AD angesehen.^[20] Nach ihr gelten Amyloidplaques als Hauptauslöser von Neurodegeneration, da diese das Parenchymgewebe zwischen den Nervenzellen gewissermaßen verkleben.^[21] Während bei gesunden Menschen A β -Peptide schnell abgebaut werden und sich nicht auf Niveaus anreichern können, die eine Bildung stabiler und toxischer Aggregate nach sich ziehen, findet der amyloidogene Weg der APP-Prozessierung bei AD-Patienten in überhöhtem Maße statt. Als Grund dafür wird ein Zusammenspiel genetischer Disposition, Alterung und Umwelteinflüssen diskutiert.^[22]

Die Ergebnisse genetischer Untersuchungen stützen die Amyloidhypothese dabei am stärksten. Der genetische Hintergrund einer AD-auslösenden Amyloidose des Gehirns wird insbesondere bei EOAD-Fällen deutlich, denen fast immer eine genetische Komponente zugrunde liegt.^[23] Es handelt sich dabei um Mutationen, die eine übermäßige Bildung von A β ₄₂ verursachen und mit nahezu 100 prozentiger Wahrscheinlichkeit eine frühe Amyloidose des Gehirns bedingen, wenn der Betroffene nur eine einzige Kopie des Gens mit der Risikomutation trägt. Unter diesen Risikogenen befinden sich zum einen solche, die direkt für APP codieren sowie andere, deren Genprodukte Presenilin 1 und 2, funktionelle Untereinheiten der γ -Sekretase, darstellen. Besonders deutlich wird dieser genetische Effekt bei Menschen mit Trisomie 21, die ein Triplikat des Chromosoms 21 tragen, auf dem auch das APP-Gen lokalisiert ist. Dessen verstärkte Expression führt bei fast allen Betroffenen ab dem 40. Lebensjahr zu AD, wobei auch hier aufgrund diagnostischer Schwierigkeiten eine große Schwankungsbreite besteht.^[18]

Auch im Zusammenhang mit LOAD-Fällen wird ein genetischer Zusammenhang diskutiert, der Erbgang ist in diesem Fall allerdings weit weniger stark ausgeprägt als bei den EOAD-Fällen. Das Apolipoprotein E (ApoE)-Gen codiert durch drei verschiedene Allele (ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4) drei Hauptisoformen des ApoE Proteins, von denen bekannt ist, dass sie den

Lipidmetabolismus beeinflussen. Der ApoE $\epsilon 3/3$ -Genotyp ist der häufigste und kommt bei 50-70% der Bevölkerung vor. Das ApoE $\epsilon 4$ Allel, von welchem nur schätzungsweise 10-15 % der Bevölkerung Träger sind, wird für die Mehrheit der LOAD-Fälle verantwortlich gemacht und wird auch in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für andere Demenzformen wie die Vaskuläre und die Lewy-Körperchen-Demenz diskutiert.^[24] Als Träger von zwei Kopien des ApoE $\epsilon 4$ Allels besteht eine vierfach höhere Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an LOAD und das statistische Alter einsetzender klinischer Demenz sinkt von 84 auf 68 Jahre. Dabei wird die ApoE $\epsilon 4$ -Isoform mit einer erhöhten Ablagerung von A β in Verbindung gebracht, obwohl auch A β -unabhängige Mechanismen von ApoE wie eine verminderte Neurogenese im Hippocampus oder eine Phosphorylierung des Tau-Proteins in Verbindung mit einer AD bedingten Tau-Pathologie nachgewiesen wurden.^[25]

In der Tat lassen diese Ergebnisse genetischer Studien die Amyloidhypothese besonders stichhaltig erscheinen. Somit dominiert diese auch derzeit die Forschung nach möglichen Therapieansätzen, die auf eine Hemmung oder Umkehr der A β -Akkumulation abzielen. Dennoch ist die Hypothese umstritten, da trotz hoher Konkordanz zwischen klinischer Diagnose und postmortaler Bestätigung einer hohen Plaquebelastung im Zentralnervensystem ein quantitativer Zusammenhang beider Befunde nach wie vor fehlt. Auch sind, wie eingangs erwähnt, Fälle dokumentiert, bei denen *post mortem* eine hohe Plaquebelastung nachgewiesen wurde, zu Lebzeiten jedoch keine Anzeichen für Demenz ersichtlich waren. Der fehlende Zusammenhang zwischen Amyloidbelastung und Schwere der Krankheit spricht gegen einen direkten Effekt.^[26]

Modellversuche mit transgenen Mäusen führten zu dem Ergebnis, dass die Konzentration löslicher A β_{42} -Oligomere im Gehirn besser mit der Schwere kognitiver Beeinträchtigung korrelierbar ist, als die Gesamtmenge der A β -Proteine.^{[23],[27]} Außerdem wurde nachgewiesen, dass diese Oligomere direkte Auslöser einer synaptischen Dysfunktion sind. Ihre exakte Struktur sowie die ihrer Bildung zugrunde liegenden Oligomerisierungsmechanismen sind noch nicht aufgeklärt.^[28] Auch ist noch nicht aufgeklärt, wie ihre Aggregation erfolgt und welche Rolle sie bei der Entstehung amyloider Plaques spielen.^[29] Man vermutet jedoch, dass Kupfer- sowie Zinkionen in nanomolaren Konzentrationen eine Aggregation löslicher A β -Peptide induzieren können.^[30] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Kupferionen von A β_{42} -Proteinen komplexiert werden können, was ihre intrazelluläre Konzentration vermindert. Da Kupferionen innerhalb der Zelle maßgeblich deren antioxidative Fähigkeit bedingen, verursacht eine Kupfer-Komplexierung durch A β_{42} steigenden oxidativen Stress der Zelle.^[30]

Zusätzlich wurden weitere schädigende Einflüsse von A β ₄₂-Proteinen auf verschiedenste Stoffwechselvorgänge in der Zelle beschrieben:

Pathologische Befunde bei AD-Patienten zeigten eine erhöhte Akkumulation mitochondrialer Abbauprodukte im Zytoplasma und in Autophagozytosevesikeln sowie eine Abnahme an funktionsfähigen Mitochondrien um etwa 25%. Aufgrund dieses Sachverhalts wurde postuliert, dass lösliche A β ₄₂-Proteine die Funktion der Mitochondrien und die Makroautophagie der Zelle beeinflussen. Da die Funktion der Mitochondrien im Wesentlichen auf der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), der Lokalisierung alkoholreduzierender Enzyme und der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase der Zelle beruht, stören A β ₄₂-Proteine diese Funktionen, wenn sie modulierend oder inhibierend auf die mitochondrialen Reaktionskaskaden einwirken.^[23] Eine Verminderung der intrazellulären ATP-Konzentration hat direkten Einfluss auf alle ATP-abhängigen Regulations- und Funktionsmechanismen der Zelle, wie etwa den axonalen Transport.

A β ₄₂-Proteine können auch die Zellvitalität direkt beeinflussen. Der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) gehört zur Proteinfamilie der Neurotrophine und stimuliert die Proliferation und Differenzierung der Nervenzelle, indem er zusammen mit der Tropomyosin-Rezeptorkinase (TrkA) und dem Pan-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) einen reaktiven Komplex bildet. Eine alleinige Bindung von NGF an p75NTR induziert jedoch das Apoptosesignal der Zelle. A β ₄₂-Proteine binden mit einer ähnlichen Affinität wie NGF spezifisch an p75NTR, was ebenso das intrazelluläre Apoptosesignal auslöst.^[31]

Außerdem können A β ₄₂-Proteine mit der in den Mitochondrien lokalisierten Alkoholdehydrogenase (ABAD), welche die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden katalysiert, wechselwirken, was zu einer intra- und extrazellulären Delokalisation von ABAD führt. Das Enzym kommt dadurch mit einem breiten Spektrum an Alkoholen in Kontakt und es kommt zu einer Überproduktion reaktiver Aldehyde, die oxidativen Stress in der Zelle auslösen und so zytotoxisch wirken.^[32]

Weiterhin können lösliche A β ₄₂-Proteine mit dem *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) interagieren, welcher die Homöostase der intrazellulären Calciumionenkonzentration reguliert. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Calcium in die Zelle.^[33]

Auch das Protein *APP intracellular domain* (AICD), hervorgegangen aus der Proteolyse von CTF β durch die γ -Sekretase, verursacht einen solchen Konzentrationsanstieg von

Calciumionen im Zellinneren. Dadurch wird in Folge die Expression calciumabhängiger Proteinkinasen und Proteinphosphatasen aktiviert. Calpain I ist eine solche Phosphatkinase, welche die Proteolyse von Dynamin-1 katalysiert. Dynamin-1 ist maßgeblich an der Exozytose von Transmittern über die präsynaptische Membran in den synaptischen Spalt beteiligt. Sinkt die Dynamin-1-Konzentration infolge einer hohen Calpain I-Aktivität, stört dies die Fähigkeit der Signaltransduktion des Neurons, da keine Transmitter mehr in den synaptischen Spalt abgegeben werden können. Stattdessen sammeln sich im Zelllumen transmitterhaltige Vesikel an und lassen die Nervenzelle anschwellen, bis sie abstirbt.^[34]

Schließlich können A β ₄₂-Proteine auch Einfluss auf die Makroautophagie der Zelle nehmen. Darunter versteht man die Proteolyse langlebiger, gefalteter oder aggregierter intrazellulärer Proteine als eine Reaktion auf einen Mangel an Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren. Zum einen induziert A β ₄₂ diesen Prozess, behindert aber auch seinen weiteren Ablauf: Autophagosomen können nicht mehr mit Lysosomen fusionieren und die Bildung von Autophagolysosomen unterbleibt, was die Proteolyse phagozytierter Proteine verhindert. Infolge der intrazellulären Anhäufung von Autophagosomen aggregieren diese. Das Neuron schwillt an und stirbt schließlich ab.^[35] Eine Erklärung für die Aggregation der Autophagozytosevesikel ist derzeit nicht bekannt, es konnte jedoch in Modellen nachgewiesen werden, dass sie immunreaktiv für Presenilin 1 sind. So zeigten diese Vesikel in Experimenten die höchste γ -Sekretaseaktivität aller getesteten Zellorganellen, was darauf hindeutet, dass A β in Autophagozytosevesikeln gebildet wird, bevor diese zu Autophagolysosomen reifen.^{[36],[37]}

Schließlich besitzen A β ₄₂-Oligomere die Fähigkeit, Proteinkinasen wie die Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) und die Glycogen-Synthetase Kinase-3- β (GSK3 β) zu aktivieren. Diese zählen zu den prolangerichteten Serin/Threonin-Phosphatkinasen, welche Tau-Proteine an spezifischen Stellen ihrer Aminosäuresequenz phosphorylieren. Die Aktivierung dieser Phosphatkinasen kann eine abnorme Hyperphosphorylierung des Proteins Tau bedingen, welches eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der Mikrotubuli spielt.^{[38],[39]} Diese Befunde weisen auf mögliche Zusammenhänge in der Pathogenese von AD zwischen A β ₄₂-Proteinen und einem gestörten Tau-Metabolismus hin, auf dessen Auswirkungen im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

1.3.2. Neurofibrillen und die Tau-Hypothese zur Entstehung von AD

Eine wichtige Grundlage der Funktion von Nervenzellen ist ein ständiger anterograder und retrograder Transport von Vesikeln, Mitochondrien oder Peroxisomen innerhalb des Neurons. Dieser Transport erfolgt entlang der Mikrotubuli. Bei diesen Zellorganellen handelt es sich um gerade, hohle Stäbe mit einem Durchmesser von etwa 24 nm und einer Länge von bis zu 25 μm . An ihnen können andere Organellen, die mit Motorproteinen wie etwa Kinesinen und Dyneinen ausgestattet sind, entlanggleiten, wodurch eine ständige Versorgung der Nervenzelle mit diesen Transportgütern gewährleistet ist. Außerdem geben Mikrotubuli der Zelle Form und Stütze. Ein einzelner Mikrotubulus besteht aus 13 langkettigen Protofilamenten, die zusammen die Röhrenstruktur bilden. Diese Protofilamente sind etwas gegeneinander versetzt, sodass eine leicht gewundene Helix mit einer Ganghöhe von 8 nm resultiert. Das eigentliche Bauelement der Protofilamente sind Tubulinmoleküle. Diese sind Dimere, die aus je einem α - und β -Tubulin zusammengesetzt sind (Abbildung 3).

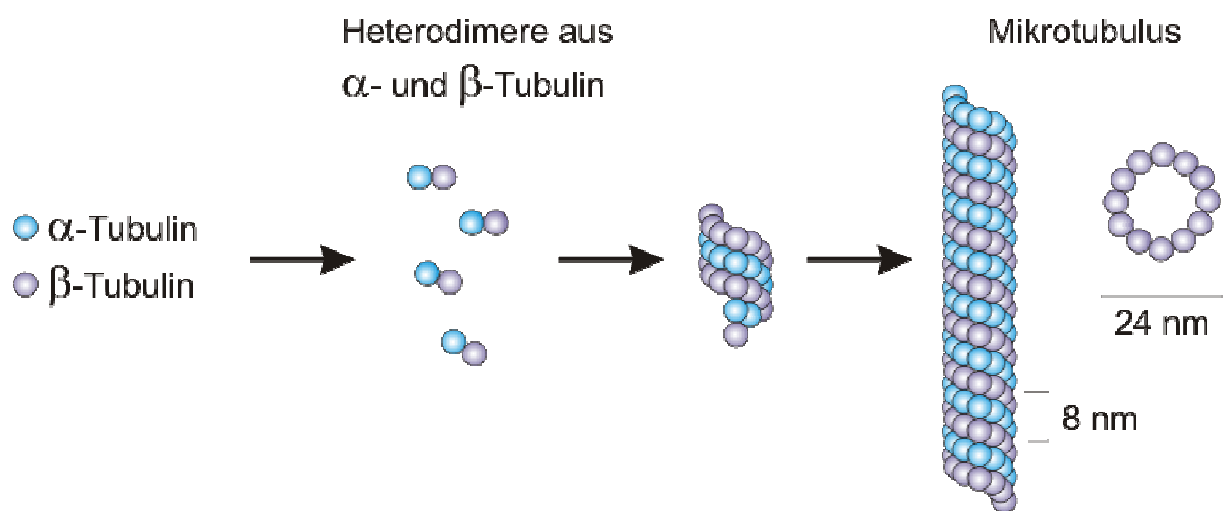


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Mikrotubuli aus α - β -Tubulin-Heterodimeren.^[40]

Infolge des helikalen Aufbaus ergeben sich Kavitäten zwischen den Windungen, die je nach den sie bildenden Monomeren als α - und β -Tubulinhöhlungen bezeichnet werden. An die Mikrotubuli selbst können weitere Proteine permanent oder temporär binden und somit deren Struktur stabilisieren. Zu solchen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) zählt das Protein Tau. Es ist das wichtigste MAP im Axon. Das humane Tau-Protein kommt durch alternative Spleißvorgänge der Exonregionen 2, 3 und 10 im Chromosom 17 in sechs Isoformen vor, die alle als Polypeptide mit Kettenlängen zwischen 352 und 441 Aminosäuren vorliegen.^[41] Sie sind aufgrund eines hohen Gehalts hydrophiler Seitenketten hoch wasserlöslich und

größtenteils ungefaltet. Am C-terminalen Ende tragen alle Isoformen drei bis vier repetitive Einheiten, welche über elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche einer α - und β -Tubulinhöhle binden können.^[40]

Das Tau-Protein besitzt über seine Sequenz verteilt mindestens 45 potentielle Phosphorylierungsstellen, an die durch die Aktivität verschiedener Kinasen Phosphatreste angeheftet werden können.^[42] Außerhalb der repetitiven Einheiten phosphorylieren hauptsächlich die Cyclinabhängige Kinase 5 (CDK5), die Glycogen-Synthetase-Kinase 3 β (GSK3 β) und die Extrazelluläre Signalregulierte Kinase 2 (ERK2). Innerhalb der repetitiven Einheiten phosphorylieren sogenannte Mikrotubuliaffinität regulierende Kinasen (MARKs).^[43] Die Affinität von Tau zu den Mikrotubuli ist erheblich vom Grad der Phosphorylierung abhängig. Liegt Tau normal phosphoryliert vor, erfährt es mit seinen repetitiven Einheiten eine elektrostatische Wechselwirkung mit den α - oder β -Tubulinhöhlen. Durch Phosphorylierung benachbarter Aminosäuren der repetitiven Einheit wird diese elektrostatische Wechselwirkung unterbunden. Den gleichen Effekt kann eine Phosphorylierung in der repetitiven Domäne haben. In gesunden Nervenzellen herrscht ein konstantes dynamisches Gleichgewicht zwischen mikrotubuligebundenem und freiem Tau (Abbildung 4).^[44]

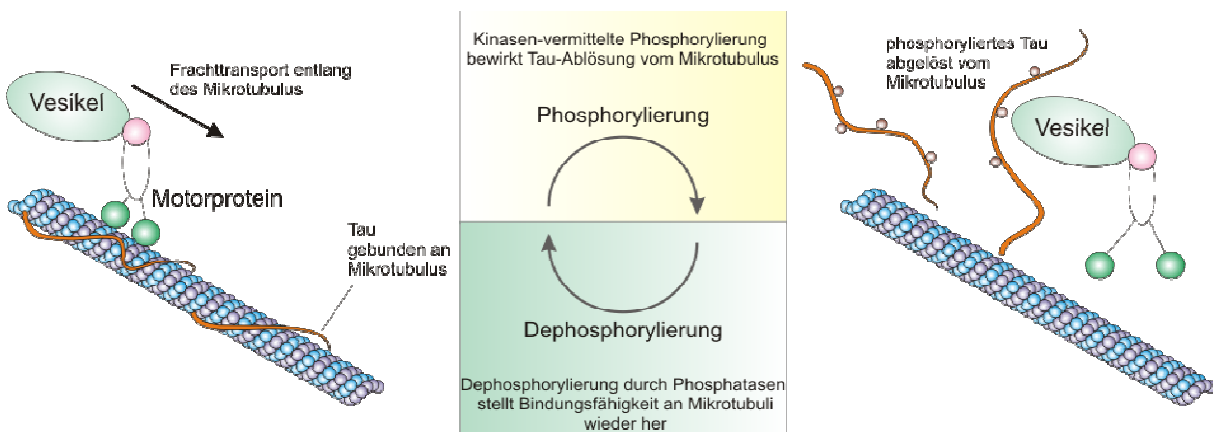


Abbildung 4: Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen mikrotubuligebundenem und freiem Tau wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung infolge regulierter Kinase- und Phosphatase-Aktivität vermittelt.^[44]

In pathologischen Untersuchungen wurde eine gesteigerte Konzentration an Tau-Proteinen im Gehirn von AD Patienten nachgewiesen, die alle eine abnorme Hyperphosphorylierung aufwiesen.^[23] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass normal phosphorylierte Tau-Proteine zwei Phosphatreste tragen, abnorm phosphorylierte hingegen neun.^[45] Nach der Tau-

Hypothese zur Entstehung von AD wird diese abnorme Hyperphosphorylierung von Tau durch ein Ungleichgewicht der Aktivitäten von Kinasen und Phosphatasen verursacht.^[46] Dies wirkt sich verheerend auf das Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Tau aus, da hyperphosphoryliertes Tau eine sehr hohe Tendenz zur Selbstassoziation besitzt und normal phosphoryliertes Tau sowie andere MAPs zu binden vermag. Es bilden sich infolge dessen β -Faltblattkonformere und aus ihnen die charakteristischen neurofibrillären Bündel innerhalb der Nervenzelle, die überwiegend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen.

Diese behindern durch ihre Anhäufung essentielle Transport- und Stoffwechselvorgänge in der Zelle. Außerdem kann die in den fibrillären Bündeln enthaltene Menge an Tau nicht mehr stabilisierend auf die Mikrotubuli wirken. Dies führt zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli, was wiederum die gesamte Morphologie der Zelle schädigt und letztlich zu einem Abriss von Reaktionskaskaden und zum Absterben der Nervenzelle führt (Abbildung 5).^[47]

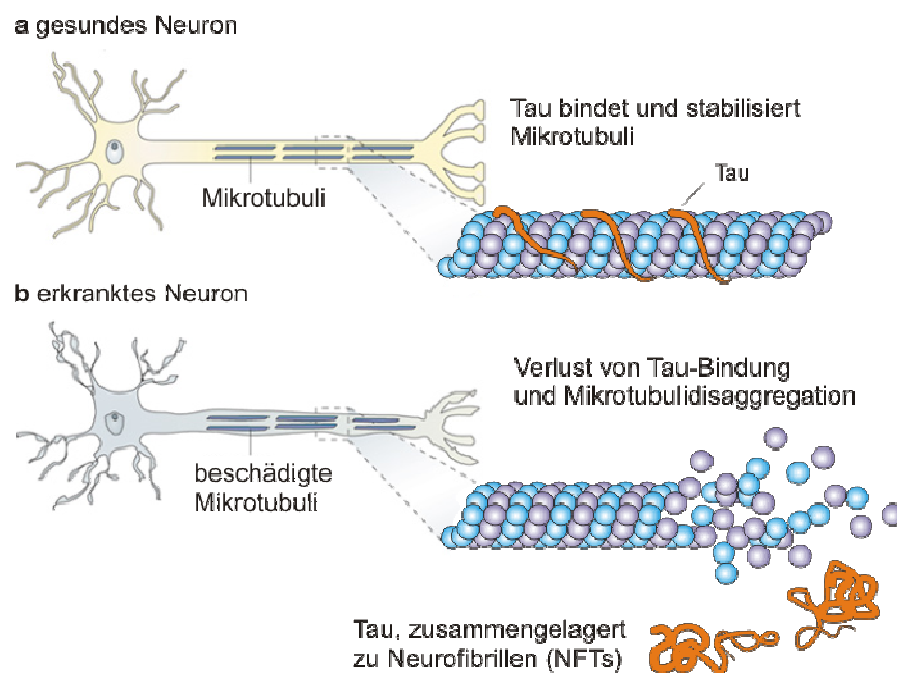


Abbildung 5: **a** Normal phosphoryliertes Tau bindet und stabilisiert Mikrotubuli im gesunden Neuron. **b** Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau zu Neurofibrillen (NFTs) verursacht Mikrotubulidisaggregation im erkrankten Neuron.^[47]

Andererseits konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der mikrotubulibindenden Domänen Ser214 und Ser262 von Tau-Proteinen deren Aggregation zu gepaarten helikalen Filamenten inhibiert, was vermuten lässt, dass Bindungen oder Wechselwirkungen zwischen den repetitiven Einheiten einzelner Tau-Proteine für deren

Aggregation verantwortlich sein könnten. Zwar ist eine Charakterisierung aller Phosphorylierungsstellen von Tau noch nicht abgeschlossen, es konnte aber gezeigt werden, dass die Mehrzahl der phosphorylierten Stellen von hyperphosphoryliertem Tau mit jenen übereinstimmen, die hauptsächlich durch GSK3 β phosphoryliert werden.^[38] Die Motive der potentiellen Phosphorylierungsstellen von Tau durch GSK3 β sind bei AD-Patienten meist vollständig phosphoryliert. Aufgrund dessen wird einer Überfunktion von GSK3 β eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung von AD gemäß der Tau-Hypothese zugeschrieben.^{[45],[48]}

1.3.3. Die Glykogen-Synthetase-Kinase 3

Die Glykogen-Synthetase-Kinase 3 (GSK3) zählt zu den prolangerichteten Serin/Threonin-Kinasen. Der Name des Enzyms leitet sich von seiner Schlüsselfunktion ab, die GSK3 im Glykogenmetabolismus einnimmt. Daneben besitzt es zahlreiche andere metabolische Funktionen und greift in Regelkreise von Zellproliferation und Apoptose ein.

Säugetierische GSK3 wird durch zwei Gene codiert, *gsk-3 α* und *gsk-3 β* , aus deren Expression Proteine von 51 und 47 kDa resultieren. Diese beiden Isoformen des Enzyms, GSK3 α und GSK3 β , sind zu 84% identisch, in ihren katalytischen Domänen sogar zu 98%. Der Hauptunterschied besteht in einer glycinreichen Erweiterung in der *N*-terminalen Domäne von GSK3 α . Säugetierische GSK3 α und GSK3 β werden ubiquitär exprimiert, wobei einige Gewebearten höhere Expressionsraten zeigen. So werden beide Isoformen des Enzyms in hohen Mengen in neuronalem Gewebe gefunden.^[49]

Bei Untersuchungen der Lokalisierung von GSK3 im durch AD geschädigten Gehirn konnte gezeigt werden, dass ein Fortschreiten der Schwere von AD sowie eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades von Tau vor allem mit einer gesteigerten Expressionsrate und Aktivität von GSK3 β in kortikalem und hippokampalem Hirngewebe einhergeht.^[50]

Strukturell handelt es sich bei GSK3 β um ein aus 482 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, in dessen Aminosäurefrequenz zwei funktionelle Domänen enthalten sind: Eine Aktivierungsschleife, definiert durch die Aminosäuren Ala96, Lys205, Asn213, Arg180 und Tyr216, sowie eine substratspezifische Domäne, zusammengesetzt aus der Gelenkregion und der glycinreichen Domäne (Abbildung 6).^{[44],[47]}

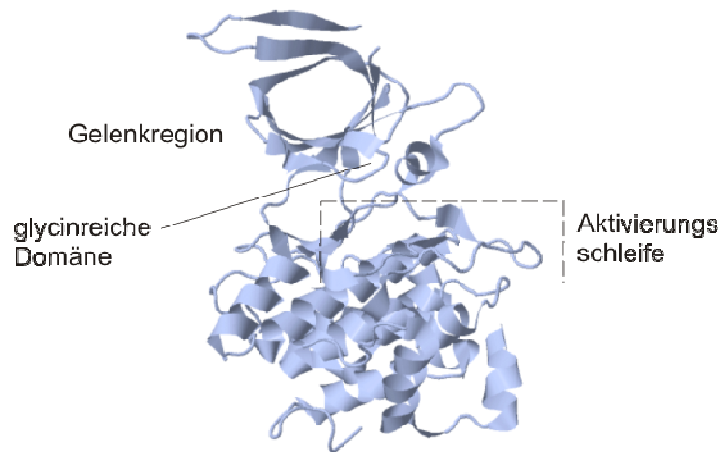


Abbildung 6: Schematische Darstellung von GSK3β mit Gelenkregion, glycinreicher Domäne und Aktivierungsschleife.^[51]

Die katalytische Aktivität des Enzyms wird durch Phosphorylierung von Tyr216 der Aktivierungsschleife durch Adenosintriphosphat oder Tyrosinkinasen gesteuert.^{[51],[52]} Durch die Phosphorylierung wird eine konformative Änderung der Seitenketten von Tyr216 induziert, wodurch das aktive Zentrum des Enzyms, bestehend aus der Gelenkregion und der glycinreichen Domäne, freigelegt wird, sodass Substrate gebunden werden können. Die Aktivität von GSK3β hängt somit vom Übergang in diese katalytisch aktive Konformation ab.^[48] Eine Phosphorylierung an Ser9 hingegen induziert eine partielle Inhibition von GSK3β, da das katalytische Zentrum für Substrate unzugänglich bleibt. Diese Art der Phosphorylierung wird durch deaktivierende Kinasen wie die Proteinkinase A katalysiert.

Der Phosphattransfer auf Substrate durch GSK3β kann auf unterschiedliche Weise erfolgen und hängt von der Art des Substrates ab: Eine Möglichkeit des Phosphattransfers ist die direkte Übertragung eines Phosphatanions auf im katalytischen Zentrum befindliche Substrate. Eine weitere Möglichkeit der Phosphorylierung ist in Form von „*primed phosphorylation*“ gegeben, wobei einer Phosphorylierung durch GSK3β eine initiiierende Phosphorylierung des Substrates durch andere Kinasen in definiertem Abstand zur GSK3β-Phosphorylierungsstelle vorangehen muss. Dieser Mechanismus ist hundert- bis tausendfach effizienter als eine Phosphorylierung ohne solches „*priming*“ und findet beispielsweise bei der Phosphorylierung der Glykogen-Synthetase durch GSK3β statt.^{[53],[54]}

Das Tau-Protein verfügt entlang seiner Aminosäuresequenz über eine Reihe unterschiedlicher Motive, die durch GSK3β phosphoryliert werden können. Sie sind vornehmlich in der

prolinreichen Region sowie am C- und N-terminalen Ende des Proteins zu finden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Tau an zwölf Motiven durch GSK3 β sowohl primerinduziert als auch direkt phosphoryliert werden kann.^{[55],[56]} Die daraus resultierenden Konformationsänderungen verhindern ein Binden von Tau an Tubulin und das Protein kann seine Stützfunktion bei der Mikrotubulistabilisierung nicht mehr einnehmen.

Pathologische Befunde zeigen, dass eine um bis zu 50% gesteigerte GSK3 β -Aktivität in gepaarten helikalen Filamenten des Tau-Proteins nachweisbar ist.^[45] Diese Befunde suggerieren einen direkten Zusammenhang zwischen der Hyperphosphorylierung von Tau durch GSK3 β und der daraus resultierenden Aggregation. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, scheinen auch A β ₄₂-Oligomere einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität von GSK3 β auszuüben. Ebenso konnte eine Interaktion von GSK3 β mit APP und eine Wechselwirkung mit Kinesin festgestellt werden.^{[38],[39]} Wie sich diese Wechselwirkungen vollziehen ist derzeit noch unbekannt, jedoch deuten diese Befunde auf einen möglichen Zusammenhang bei der Entstehung von Tau-Fibrillen und A β -Aggregaten hin.

1.4. Therapeutische Ansätze zur Behandlung von AD

Die Entwicklung erster Wirkstoffe zur Behandlung von AD basierte auf verhaltenspharmakologischen Studien sowie auf einem bei den Betroffenen nachgewiesenen Defizit im Acetylcholin-Neurotransmittersystem und dem Verlust an cholinergen Neuronen. So setzte man auf die Zufuhr von Inhibitoren der Acetylcholinesterase, einem Enzym, das den Neurotransmitter Acetylcholin nach dessen Freisetzung in den synaptischen Spalt im Zuge der Signaltransduktion wieder abbaut. Acetylcholinesterase-Hemmer sorgen für einen verlangsamten Abbau dieses Transmitters. Das soll zum einen der Verminderung des Acetylcholinniveaus durch das Absterben von Neuronen entgegenwirken, die diesen Botenstoff produzieren, und bewirkt zum anderen, dass sich die Transmittermoleküle länger im synaptischen Spalt befinden und somit die Rezeptoren der postsynaptischen Membran länger aktivieren, was wiederum eine Verstärkung der Signalweiterleitung bewirkt.^[23]

Dieses Konzept zielt zwar auf eine Behandlung der kognitiven Störungen ab, lässt jedoch die ihnen zugrunde liegende Pathologie außer Acht. Die therapeutische Wirksamkeit ist mäßig und meist nur von kurzer Dauer. Acetylcholinesterasehemmer finden daher meist bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD Anwendung.

1.4.1. A β -gerichtete Therapien der AD

Wie bereits erwähnt basiert die Entwicklung neuerer Substanzen zur Behandlung von AD größtenteils auf der Amyloid-Hypothese und adressiert verschiedene Schritte des amyloidbildenden Stoffwechselweges von APP.

Die in Abschnitt 1.3.1. beschriebenen Wege der amyloidogenen und nicht amyloidogenen APP-Prozessierung legen drei Strategien im Hinblick auf eine Inhibition oder Modulation der beteiligten Enzyme zur einer Reduktion der A β -Bildung nahe:

Eine Inhibition der γ - oder der β -Sekretase, um die amyloidogene APP-Prozessierung zu vermindern oder eine Stimulation der α -Sekretaseaktivität, um den nicht amyloidogenen Weg gegenüber dem amyloidogenen zu favorisieren. Ebenso wird an Hemmstoffen der Amyloidaggregation gearbeitet. Zusätzlich werden verschiedene immuntherapeutische Ansätze verfolgt.

Inhibition und Modulation der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase war das erste Target des amyloidogenen Wegs, das zur Entwicklung von Medikamenten untersucht wurde. Es existieren zahlreiche Verbindungsklassen, die eine inhibitorische Wirkung auf die γ -Sekretase ausüben. Ihre Wirksamkeit wurde in transgenen Mausmodellen eingehend dokumentiert. So konnte in einigen Fällen eine Absenkung des A β -Spiegels am stärksten im Plasma, gefolgt von der Rückenmarksflüssigkeit (CSF) und im Gehirn nach nur einmaliger Verabreichung nachgewiesen werden.^[57] Die Gesamtmenge von A β im Gehirn älterer Mäuse mit Amyloidplaques änderte sich nach akuter Behandlung jedoch nicht, da die Gesamtmenge an A β im Gehirn aufgrund des Überschusses an nur langsam umsetzbaren A β -Aggregaten nahezu konstant blieb. Außerdem stellte sich eine Inhibition der γ -Sekretase dahingehend als problematisch heraus, dass durch eine Inhibition die Umsetzung weiterer Substrate dieses Enzyms verhindert wird. Für die meisten dieser Substrate konnte anhand von Untersuchungen nicht belegt werden, dass ihre verminderte Spaltung infolge einer γ -Sekretase-Inhibition nachteilig ist.^[58] Dies bedeutet allerdings nicht, dass Langzeitstudien diese Erkenntnisse nicht widerlegen könnten. Die wichtige Bedeutung der γ -Sekretase für das Protein Notch hat hingegen die Weiterentwicklung von γ -Sekretase-Inhibitoren stark eingeschränkt. Bei diesem handelt es sich um einen Rezeptor, der am Anfang eines weit verbreiteten Signaltransduktionsweges steht, durch den Zellen auf äußere Signale reagieren. Vor allem bei der Embryonalentwicklung hat sich die Notch-Prozessierung durch die γ -Sekretase als besonders wichtig herausgestellt.^[59] Studien haben gezeigt, dass eine γ -

Sekretase-Inhibition bei adulten Mäusen eine Atrophie des Thymus, eine Hemmung der B-Zellen in der Milz sowie eine Hyperplasie der Becherzellen im Darmepithel auslöst.^[60]

Durch die Beobachtung, dass einige nichtsteroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) das Muster der A β -Peptide in zellulären Tests so veränderten, dass die Konzentration von A β_{42} abnahm, die von A β_{40} dabei gleich blieb und die von A β_{38} zunahm, gewann eine solche Modulation der γ -Sekretase an Interesse.^[61] Da vornehmlich A β_{42} für Zelltoxizität und Initiation der A β -Aggregation verantwortlich gemacht wird, während die kürzeren Isoformen eine geringere Aggregationstendenz besitzen, erscheinen γ -Sekretase-Modulatoren als besonders vielversprechende Therapeutika.^[62] Außerdem bleibt durch sie die Notch-Signalkaskade unberührt.^[63]

Inhibition der β -Sekretase

Ein zweiter wichtiger Ansatzpunkt zur Verminderung der A β -Expression ist durch eine Inhibition der β -Sekretase gegeben. Die normale biologische Funktion der β -Sekretase ist unbekannt. *BACE-knockout* Mäuse sind in ihrer A β -Produktion gehemmt, was suggeriert, dass in diesen Mäusen keine kompensatorischen Mechanismen für eine Spaltung durch die β -Sekretase zur Verfügung stehen. Diese Mäuse zeigten keine gesundheitlichen Auffälligkeiten, einige Studien berichteten jedoch von Veränderungen der Myelinisierung peripherer Nervenfasern und Verhaltensveränderungen.^[64] Die Folgen einer β -Sekretase-Inhibition für den Menschen ist unbekannt. Die ersten Inhibitoren der β -Sekretase waren Peptidmimetika, die in zellulären Testsystemen oft nur schwach wirksam und daher für in-vivo-Experimente ungeeignet waren. Inzwischen sind auch nichtpeptidische Hemmstoffe bekannt, es fehlen jedoch nach wie vor Ergebnisse, die eine solide Aktivität nach oraler Verabreichung in Tiermodellen belegen.^[65]

Stimulation der α -Sekretase

Eine Erhöhung der α -Sekretaseaktivität soll die Menge an APP senken, die dem amyloidogenen Weg als Substrat zur Verfügung steht. In der Tat konnte belegt werden, dass sich die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung über Rezeptoren auf der Zelloberfläche anregen lässt.^[66] Die möglichen Nebenwirkungen eines solchen Ansatzes sind unbekannt. Eine Stimulation der α -Sekretase wurde eingehend im Zusammenhang mit M $_1$ -Muskarin-Rezeptor-Antagonisten zur Verbesserung geistiger Leistungsfähigkeit dokumentiert, welche auch im Rahmen kleiner klinischer Studien eine Reduktion der A β -Produktion bewirkt

haben.^[67] Die Entwicklung solcher Rezeptoragonisten wurde vor allem durch die Schwierigkeit der Identifikation M_1 -spezifischer Moleküle behindert, die keine Nebenwirkungen durch die Aktivierung anderer muskarinerger Rezeptoren verursachen. Kein solcher Wirkstoff befindet sich derzeit in klinischen Studien zu AD.

A β -Aggregationsinhibitoren

Während Enzyminhibitoren und –modulatoren die Anreicherung von A β -Peptiden verhindern sollen, zielt das Konzept von A β -Aggregationsinhibitoren darauf ab, die Stabilisierung der A β -Peptide und ihre Zusammenlagerung zu größeren Oligomeren und schließlich zu makroskopischen Plaques zu unterbinden. Sollten die jeweiligen Peptidwechselwirkungen bei der Bildung von A β -Oligomeren und größerer Fibrillen die gleichen sein, könnte eine sie induzierte Aggregationshemmung die Entsehung sowohl toxischer Oligomere als auch makroskopischer Plaques verhindern. Einige ausgewählte Verbindungen, die in klinischen Studien getestet wurden oder sich derzeit in der Testphase befinden, erwiesen sich im Tierversuch bei der Verringerung der Konzentration von A β -Oligomeren im Plasma als wirksam.^{[23],[68]}

Ein weitere Ansatzpunkt zur Aggregationsinhibition ist durch die Rolle von Metallionen wie Zink und Kupfer bei der Amyloid-Pathologie gegeben (siehe Abschnitt 1.3.1.). Dies führte zur Erforschung oral verfügbarer, hirngängiger Substanzen, welche die Protein-Metall-Wechselwirkung herabsetzen sollten. Von einer solchen Verbindung wird berichtet, dass sie die Amyloidpathologie in APP-transgenen Mäusen drastisch reduzieren kann.^[69]

A β -Immuntherapie

Eine mögliche Immuntherapie basiert auf Untersuchungen an transgenen Mäusen, bei denen eine Injektion von humanem fibrillären A β_{42} die Bildung von anti-A β -Antikörpern stimulierte. Man beobachtete, dass bei so immunisierten Mäusen eine Plaqueablagerung im Vergleich zu ungeimpften Tieren stark erniedrigt war.^[70] Die Verringerung der A β -Ablagerungen ging auch mit einer Verbesserung der Gedächtnisleistung einher. Vergleichbare Effekte konnten auch durch eine passive Impfung mit monoklonalen Antikörpern erzielt werden. Wie bei der aktiven Impfung reduzierte sich durch die Gabe von Antikörpern nicht nur die A β -Belastung im Gehirn, sondern auch die Beeinträchtigung beim räumlichen Lernen der Tiere.^[71] Dass eine Übertragung des Immunisierungsprinzips auf den Menschen möglich ist, konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Derzeit werden verschiedene passive

Impfungen mit humanen oder humanisierten A β -Antikörpern gegen verschiedene Epitope des A β -Peptids klinisch getestet.^[26]

1.4.2. Tau-gerichtete Therapien der AD

Die Entwicklung von Therapien, die vornehmlich die Tau-Pathologie als grundlegenden Faktor der Entstehung von AD adressieren, ist gegenüber denen, die auf Amyloid- β ausgerichtet sind, weit abgeschlagen. Es gibt verschiedene Gründe für den relativ langsamen Fortschritt dieser Entwicklung. Beispielsweise gab es bis 1998, anders als bei A β , keinen genetischen Hinweis, der eine Tau-Dysfunktion mit Neurodegeneration in Verbindung brachte. Trotzdem erscheint eine Behandlung einer Tau-Pathologie dank neuerer Forschungsergebnisse vielversprechend. Ebenso wie bei A β implizieren bei Tau die komplexen Faltungswege, welche ausgehend von nicht-toxischen nativen Peptidmonomeren zu Fibrillen durchlaufen werden, zahlreiche potentielle Angriffspunkte zur Aggregationsinhibition und Disaggregation. Die zugrundeliegenden physiologischen Prozesse sind allerdings weit weniger gut erforscht. Ein entsprechender Mangel an bekannten durch Wirkstoffe adressierbarer Targets macht eine Entwicklung von Verbindungen schwierig, die zur klinischen Verabreichung geeignet sind.

Dennoch könnten Tau-gerichtete Therapien signifikante Vorteile aufweisen. Neuropathologische Studien haben bereits gezeigt, dass eine sehr hohe Korrelation zwischen Dichte und Verteilung neurofibrillärer Tau-Aggregate und kognitiver Beeinträchtigung besteht.^[43] Anders als bei A β sind auch keine Fälle dokumentiert, bei denen trotz hoher Tau-Belastung keine Demenzsymptome feststellbar waren.^[11]

Zwar gibt es zur Zeit keine Belege dafür, dass eine Tau-Hyperphosphorylierung und – Aggregation im Falle von AD genetische Ursachen haben, es sind jedoch andere neurodegenerative Krankheiten bekannt, denen eine ähnliche krankhafte Veränderung von Tau zugrunde liegt. Zu diesen Tauopathien zählen beispielsweise die progressive supranukleäre Blickparese (PSB) sowie die Frontotemporale Demenz (FTD).^[72] Bei FTD ist bekannt, dass sie durch Mutationen des Tau-codierenden Gens ausgelöst werden kann, was wiederum suggeriert, dass diese Genvarianten auch eine Tau-Aggregation fördern.^[73]

In Verbindung mit der sehr hohen Korrelation zwischen Tau-Belastung und Neurodegeneration bei AD untermauern diese Ergebnisse die Theorie, dass Tau eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Prozessen bei AD einnimmt. Das kann möglicherweise auch bedeuten, dass eine erfolgreiche Tau-Therapie sogar eine Besserung für Patienten in

Spätstadien verspricht, ganz im Gegensatz zu Behandlungen, die alleine auf Amyloid- β ausgerichtet sind. Der im Vergleich zu AD schnelle Krankheitsverlauf bei anderen Tauopathien wie PSB würde auch bedeuten, dass eine Bestätigung klinischer Wirksamkeit in kleineren und kürzeren Studien erhalten werden könnte, als im Vergleich zu Studien über AD.

Niedermolekulare Inhibitoren der Tau-Aggregation und Kinaseinhibitoren zur Verhinderung einer Tau-Hyperphosphorylierung haben besondere Beachtung zur Behandlung bzw. Prävention einer Tau-Pathologie erfahren.^[74]

Mit der Entwicklung entsprechender Medikamente zur Aggregationsinhibition sind allerdings gewisse Schwierigkeiten verbunden. Die Identifikation von Molekülen, die spezifisch die entsprechenden Protein-Protein-Wechselwirkungen über relativ große Interaktionsräume der Proteinoberfläche unterbinden, ist problematisch, obwohl tauspezifische Hexapeptidmotive entscheidend zur Aggregation beitragen. Aus dem Screening von Substanzbibliotheken im Rahmen von Tau-Aggregationsassays gingen zahlreiche Strukturklassen hervor, die *in vitro* eine Inhibition der Tau-Aggregation oder eine Disassemblierung von Tau-Aggregaten auslösen können. Es handelt es sich dabei allerdings meist um ionische Verbindungen, was ein Passieren von Membranen erheblich erschwert und eine Applikation *in vivo* ausschließt. Daher steht derzeit vor allem die gezielte Entwicklung zellgängiger Substanzen und somit die Optimierung hin zu ladungsneutralen, zellgängigen Inhibitoren im Vordergrund.^[75]

Die zur Zeit am weitesten fortgeschrittene klinische Studie zur Tau-Disaggregation beruht auf dem Einsatz von Metylenblau unter dem Namen Rember®. Es wird berichtet, dass durch diesen Wirkstoff Tau-Filamente *in vitro* aufgelöst werden konnten, die aus AD-geschädigten Gehirnen isoliert wurden und dass eine Tau-Aggregation in Zellsystemen beobachtet werden konnte.^[76]

Im Gegensatz zur Aggregationsinhibition erscheinen Strategien, die auf eine Reduktion der Tau-Hyperphosphorylierung ausgerichtet sind, konzeptionell einfacher und werden daher häufiger verfolgt. Um die Hyperphosphorylierung von Tau und damit dessen gesteigerte Aggregationstendenz zu unterbinden, wird eine Inhibierung der phosphorylierenden Kinasen angestrebt. So konnten im Rahmen von *in vitro*-Experimenten zahlreiche potente GSK3 β -Inhibitoren identifiziert werden. Zwar erleichtern publizierte Röntgenstrukturanalysen von GSK3 β -Inhibitor-komplexen das rationale Design neuer aktiver Hemmstoffe zusätzlich, allerdings üben viele dieser Substanzklassen eine ebenso starke Inhibition auf GSK3-strukturverwandte Enzyme aus.^{[48],[77]}

Für die von AstraZeneca entwickelte Substanz AR-A014418 scheint dies nicht zu gelten. Diese inhibiert GSK3 β im nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 2,5 \mu M$) und übt dabei nur geringen Einfluss auf die Aktivität anderer Kinasen aus.^[78] AR-A014418 ist hoch selektiv für eine ATP-kompetitive Hemmung von GSK3 β , wobei eine Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr134 und Val135 der ATP-bindenden Aktivierungsschleife des Enzyms und den Wasserstoffbrückenakzeptoren des Inhibitors vorgeschlagen wird. Ein Nachteil von AR-A014418 ist dessen schlechte Bioverfügbarkeit, durch die ein Passieren der Blut-Hirn-Schranke nicht gewährleistet ist. Ein weiterer irreversibler GSK3 β -Inhibitor von Noscira befindet sich derzeit unter dem Namen Tideglusib® in Phase IIb.^[79]

Neue Beobachtungen, dass extrazelluläre Tau-Spezies die Bildung von Neurofibrillen in transgenen Mäusen vorantreiben können, suggerieren, dass ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle bei der Ausbreitung einer Tau-Pathologie im AD-geschädigten Gehirn spielen könnte.^[80] Dies eröffnet die Möglichkeit, dass Immuntherapien, vergleichbar mit denen zur Bekämpfung von Amyloid- β , ebenso einen Ansatzpunkt zum Abbau einer Tau-Pathologie darstellen. In der Tat wird in neuesten Berichten von einem solchen Erfolg bei der Reduzierung von Tau-Pathologien in transgenen Mausmodellen durch aktive Immunisierung mit Tau-Peptiden berichtet.^[81] Es besteht demnach weiterhin ein hohes Interesse an der Entwicklung Tau-gerichteter Therapien, und obwohl eine Vielzahl wichtiger Fragen noch unbeantwortet ist, bleibt die Bedeutung eines Aufhaltens oder einer Verlangsamung der Tau-Pathogenese zu einer positiven Beeinflussung des Krankheitsverlaufes von AD bestehen. Zusätzlich könnte eine kombinierte Amyloid- und Tau-Therapie den effektivsten Ansatz zur Verlangsamung des klinischen Fortschreitens von AD bieten. Unter den zahlreichen Methoden der Wirkstoffentwicklung besteht ein vielversprechender moderner Ansatz im Design von Liganden, die gleichzeitig mehrere Targets adressieren, man spricht von *multi-target-directed ligands*.^[43] Diese Methode wurde vor allem zur Behandlung von Krankheiten konzipiert, die auf komplexen pathologischen Mechanismen basieren. Da bisher keines der bekannten pathologischen Merkmale von AD als eindeutiger und alleiniger Auslöser von Neurodegeneration identifiziert werden konnte, gilt AD derzeit als die am weitesten verbreitete multifaktorielle neurodegenerative Erkrankung.

1.5. Bildgebende Verfahrenstechniken zur Diagnose von AD

Da zur Zeit der klinischen Manifestation von ersten Demenzanzeichen bereits signifikante irreversible Schädigungen des Gehirns durch AD zu verzeichnen sind, stellen Verfahren, die

eine frühere Diagnose der Krankheit ermöglichen, eine wichtige Voraussetzung für potentielle therapeutische Ansätze zum Aufhalten oder Verlangsamen des Krankheitsfortschrittes dar. Dazu werden verschiedene Messverfahren herangezogen, wobei konkrete strukturelle und funktionelle Veränderungen im Gehirn, die auf die Erkrankung zurückzuführen sind und in Schwere oder Häufigkeit mit dem Krankheitsfortschritt korrelieren und meist durch *post mortem* Untersuchungen entdeckt wurden, als Biomarker dienen. Erst im Rahmen solcher *in vivo* Studien wird deutlich, ob eine pathologische Veränderung wirklich als valider Biomarker zu bewerten ist. So weiß man bis heute nicht, in welchem Ausmaß Patienten mit präklinischer AD in Form der charakteristischen Proteinaggregate in Form von A β und Tau tatsächlich eine Demenz entwickeln.^{[82],[83]}

Neben einer Frühdiagnose verspricht man sich von bildgebenden Verfahren die Möglichkeit der Abgrenzung einer durch AD verursachten Demenz gegenüber anderen Demenzformen, denn nicht jedes erste Anzeichen von Demenz bedeutet, dass eine AD-Pathologie zugrunde liegt. So ist beispielsweise die *leichte kognitive Beeinträchtigung (mild cognitive impairment, MCI)* ein klinisches Syndrom, das ebenso Gedächtnisdefizite und Störungen weiterer kognitiver Fähigkeiten bedingt.^[84] Zwar besitzen MCI-Patienten statistisch ein höheres Risiko, später an AD zu erkranken, jedoch bleibt ein signifikanter Anteil von ihnen über Jahre stabil oder kehrt zum Normalzustand zurück. Dies deutet darauf hin, dass klinische MCI-Symptome nicht zwingend auf AD-verwandte Ätiologien zurückzuführen sind.

Die klassischen Tomographieverfahren wie die **Computertomographie** (CT) oder die **Magnetresonanztomographie** (MRT) werden häufig zur Untersuchung von Patienten mit Demenzanzeichen herangezogen.^[85] Bei der CT wird durch eine Abfolge von Röntgenaufnahmen eine schichtweise Abbildung des Gehirns erhalten. Die MRT liefert diese Informationen durch Ausnutzung gewebespezifischer Relaxationszeiten nach Anlegen eines starken Magnetfeldes. Zusätzlich werden dem Patienten hierbei Kontrastmittel verabreicht, die Einfluss auf die Spinrelaxation nehmen. Beide Verfahren ermöglichen eine Visualisierung einer AD-bedingten Hirnatrophie und das Ausschließen anderer Faktoren kognitiver Störungen wie Tumoren oder Hirnblutungen. Dabei zeigt der mittlere Temporallappen mit einer 20%igen Volumenabnahme des Hippocampus die größte Veränderung in Stadien leichter AD-bedingter Demenz.^[86] Zwar sind auch andere Gehirnregionen von einer Atrophie betroffen, jedoch sind diese Veränderungen außerhalb des mittleren Temporallappens weniger schwerwiegend und von höherer Variabilität.^[87] Eine sichere oder gar frühzeitige Diagnose von AD ermöglichen diese Verfahren jedoch nicht, da der Biomarker Hirnatrophie erst in

späten Stadien als Folge stark fortgeschrittenen Nervenzellsterbens beobachtbar ist und in gewissem Maße auch bei gesunden Probanden als normale Alterungserscheinung auftritt und daher mit einer hohen Varianz belastet ist.^[88]

Die Detektion pathologischer Veränderungen im Gehirn lebender Patienten wurde durch die Weiterentwicklungen der **Positronen-Emissions-Tomographie** (PET) möglich, die auf dem Einsatz von Radiopharmaka beruht. Infolge ihres radioaktiven Zerfalls senden solche Markierungssubstanzen Positronen aus, die dann orts aufgelöst detektierbar sind und anhand anschließender Rechenroutinen Informationen auf molekularer Ebene liefern können.^[85]

Wie bereits erwähnt schließen frühe AD-bedingte Gehirnveränderungen ein Nachlassen synaptischer Funktionen ein. Eine Verminderung des Glukosemetabolismus sowie der Durchblutung des Gehirn sind Kennzeichen einer solchen synaptischen Dysfunktion. Dies kann mit Hilfe von [¹⁸F]-Fluordesoxyglucose **1** PET (FDG-PET) nachgewiesen werden (Abbildung 7).^[89] Ein charakteristisches Muster von Hypometabolismus in der temporal-parietalen Region des Cortex, die eine wichtige Rolle bei der Bildung des episodischen Gedächtnisses spielt, liegt bei bestehender Demenz im Rahmen von AD vor und liefert infolge einer verminderten Aufnahme von FDG **1** schwächere PET-Signale im Vergleich zu nicht geschädigten Arealen. Die zeitliche Auflösung dieses Verfahrens ist jedoch eher schlecht.

Verbesserte PET-Verfahren, die eine Frühdiagnose von AD auf molekularer Ebene ermöglichen sollten, zielten ganz ähnlich wie die medikamentösen Therapien zunächst auf A β als Biomarker der Erkrankung ab. Hierzu wurden neue Liganden entwickelt, welche selektiv A β markieren sollen. Der bekannteste Vertreter zur Markierung von A β ist die ¹¹C-markierte Verbindung Pittsburgh Compound-B (PiB) **2** (Abbildung 7).^[90] Anhand solcher Studien konnte zunächst gezeigt werden, dass die Menge an A β -Ablagerungen, die im Gehirn lebender AD-Patienten mittels [¹¹C]PiB-PET bestimmt wurde, eng mit den Ergebnissen von histochemischen Untersuchungen von Hirngewebe *post mortem* übereinstimmte.^[83]

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die ¹⁸F-markierte PET-Sonde Florbetapir **5** (Abbildung 7).^[91] Damit konnte dokumentiert werden, dass durch die Verwendung solcher Marker eine realistische Visualisierung von A β im lebenden Patienten möglich ist. Anschließend wurde in zahlreichen Studien belegt, dass bei Patienten eine hohe A β -Belastung detektiert werden konnte, bevor erste Demenzsymptome oder gar irgendeine Form kognitiver Beeinträchtigung bemerkbar waren.^[92] Die kombinierte Durchführung von FDG-PET und [¹¹C]PiB-PET zeigt

Zwar gibt es einige Berichte über die *in vitro* Evaluation neuer PET-Marker für eine Visualisierung von Tau-Aggregaten, keiner von ihnen wird jedoch derzeit für die klinische *in vivo* Diagnostik angewendet.^{[93],[94]}

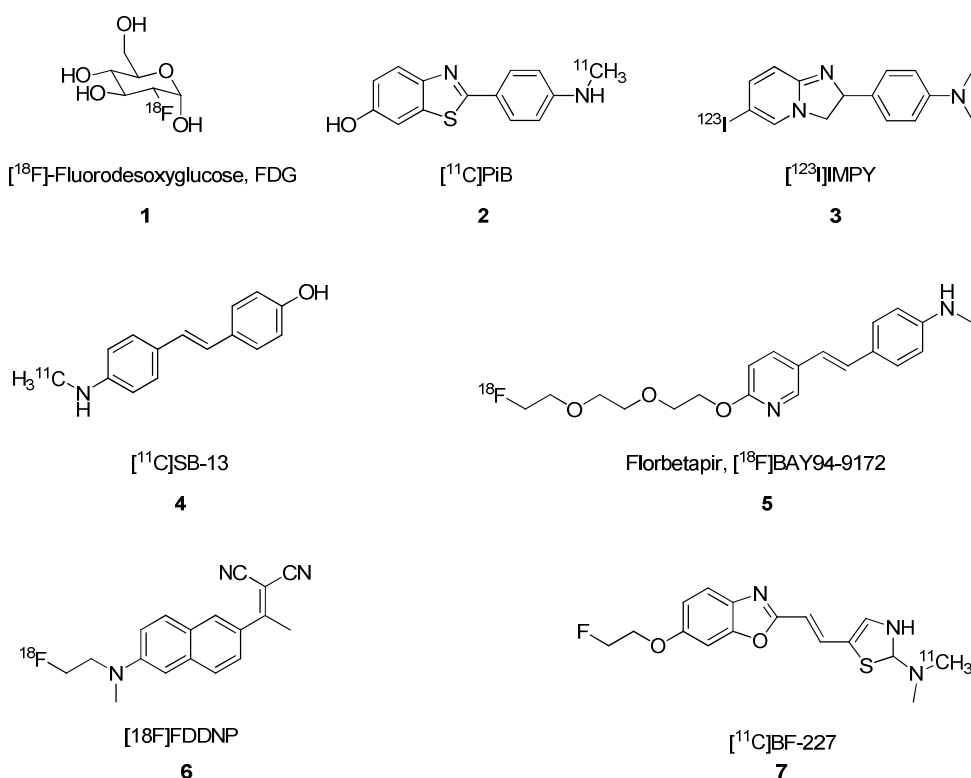


Abbildung 7: Strukturen klinisch verwendeter PET- und SPECT-Proben für die *in vivo* Diagnostik von AD. Bis auf FGD handelt es sich um Marker für amyloide Plaques.^[95]

25

Radionuklid	Halbwertszeit	Art des Zerfalls	Maximale spezifische Aktivität (GBq/mol)
^{11}C	20.4 min	β^+ (99 %)	$3.4 \cdot 10^{11}$
^{13}C	9.96 min	β^+ (99 %)	$6.9 \cdot 10^{11}$
^{15}O	2.07 min	β^+ (99.9 %)	$3.4 \cdot 10^{12}$
^{18}F	109.7 min	β^+ (97 %)	$6.3 \cdot 10^{10}$
^3H	12.3 Jahre	β^- (100 %)	$1.1 \cdot 10^6$
^{14}C	5730 Jahre	β^- (100 %)	$2.3 \cdot 10^3$
^{123}I	13 h	γ	$2.5\text{-}4.5 \cdot 10^{11}$

Tabelle 1: Halbwertszeiten, Zerfallsart und maximale spezifische Aktivität der wichtigsten Radionuklide für PET- und SPECT-Anwendungen.^[92]

Neben der erforderlichen Infrastruktur zur Isotopenherstellung, Ligandensynthese, -aufreinigung und -analyse werden zusätzlich die eigentlichen PET-Scanner benötigt, was dieses Verfahren zeitaufwendig und teuer macht und es auf ausgewiesene Zentren beschränkt. Eine routinemäßige Anwendung und die Untersuchung ganzer Jahrgänge ist nicht denkbar.

Die **Einzelphotonen-Emissions-Tomographie** (SPECT) visualisiert ebenso die Verteilung eines Radiopharmakons im Körper, deren Radionuklide jedoch Gammastrahlung emittieren.^[96] Die einzige SPECT-Probe für die Markierung von A β -Plaques ist IMPY 3 (Abbildung 7). Aufgrund des Iodisotops ^{123}I besitzt es eine höhere Halbwertszeit als die PET-Sonden und eine Detektion mit Gammakameras ist kostengünstiger. Allerdings ist die räumliche Auflösung sowie die Sensitivität der SPECT geringer, was die bildgebende Effizienz im Vergleich zur PET, auch bezogen auf den notwendigen Einsatz des Radionuklids, erheblich mindert.^[97]

Die durch [^{11}C]PiB-PET-Imaging gewonnenen Erkenntnisse sind vor allem von akademischem Interesse, wobei gerade die Schwächen und Unstimmigkeiten dieses als Frühdiagnose intendierten Verfahrens neuen Aufschluss über die Pathologie von AD lieferten. Wie bereits erwähnt ist im Falle von ^{11}C -PiB-PET-Imaging grundlegend eine gute Übereinstimmung zwischen Marker-Aufnahme von AD-geschädigten Hirnregionen *in vivo* und histochemischen *post mortem* Untersuchungen bezüglich der A β -Belastung gegeben. Basierend auf der absoluten PiB-PET-Aufnahme im Gehirn wurden Patienten in Gruppen mit hoher und geringer PiB-PET-Aufnahme, PiB-PET (+) und PiB-PET (-), unterteilt.^[98] Die exakte Definition eines pathologischen A β -Spiegels bleibt dabei offen. Daten von 15

Forschungsgruppen haben gezeigt, dass 96% von 341 klinisch diagnostizierten AD-Patienten und 24% von 651 kognitiv normalen älteren Kontrollgruppen PiB-PET (+), also positiv auf A β -Aggregate, getestet wurden.^[99] Einerseits können diese Ergebnisse als Beleg für die Sensitivität von PiB-PET-Imaging gewertet werden, andererseits verdeutlichen sie auch, dass eine vorliegende A β -Pathologie nicht spezifisch für die Demenzphase von AD ist. Gleiches ist bereits aus Autopsiestudien bekannt, lässt sich jedoch durch PiB-PET auch *in vivo* belegen. Um zu untersuchen, wie sich eine bestehende A β -Pathologie *in vivo* weiterentwickelt, wurde im Rahmen einer kürzlich durchgeführte Longitudinalstudie mit periodisch durchgeführten PiB-PET-Scans bei klinisch diagnostizierten AD-Patienten über zwei Jahre von einem jährlichen Anstieg der absoluten PiB-PET-Aufnahme um 4% berichtet.^[100] Solche Veränderungen sind jedoch ausgesprochen klein und könnten zum einen auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden, zum anderen zeigen sie substanzielle Variabilität zwischen einzelnen Patienten. Einige Studien wiesen sogar keinen signifikanten Anstieg der PiB-PET-Aufnahme im Verlauf des Krankheitsfortschritts nach.^[101] Dies kann einerseits bedeuten, dass eine Zunahme von A β -Ablagerungen dann extrem langsam verläuft, bei Patienten mit bereits bestehender AD-Demenz ein Plateau erreicht, oder dass es sich bei A β -Aggregaten um keinen validen Indikator für AD handelt. Gerade letzteres scheint derzeit nicht gesichert, da die konkrete Bedeutung von A β -Aggregaten für Diagnostik, Prognose und Risikoeinschätzung von AD nicht hinreichend belegt ist.^[102]

Fluoreszenz- und Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie sind bildgebende Verfahrenstechniken, bei denen man sich der Fluoreszenz zu untersuchender Strukturen bedient. Dabei werden Fluorophore durch Einstrahlung von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Das von ihnen im Anschluss wieder emittierte langwelligere Licht wird detektiert. Im Idealfall sind die zu adressierenden Strukturen selbst fluoreszent. Meist ist dies jedoch nicht der Fall und eine entsprechende Anfärbung mit fluoreszierenden Farbstoffen erforderlich.^[103] Man bedient sich hierzu meist eigens synthetisierter fluoreszenter Verbindungen, um die zu untersuchenden Strukturen selektiv zu markieren.

Die Elektronen der äußeren Orbitale eines Fluorophormoleküls bestimmen sowohl seine Effizienz als fluoreszente Verbindung als auch die Wellenlänge der absorbierten und emittierten Strahlung. Absorbieren fluoreszente Verbindungen in ihrem Grundzustand Lichtenergie in Form von Photonen, treten dadurch Veränderungen in den Elektronen-, Schwingungs- und Rotationszuständen des Moleküls ein. Durch die absorbierte Energie können Elektronen innerhalb von Femtosekunden in energetisch höher gelegene Orbitale

angehoben und so in einen angeregten Zustand überführt werden. Für gewöhnlich setzt dieser Anregungsprozess auch Molekülschwingungen in Gang, bei denen die interatomaren Abstände variieren. Sämtliche absorbierte Energie wird mit der Zeit wieder abgegeben, dabei sind Schwingungsrelaxation und Fluoreszenz die Hauptwege, über die das Fluorophor in seinen energetischen Grundzustand zurückkehrt. Die Fluoreszenz kommt dabei durch die Abgabe der Energie angeregter Elektronen in Form von Photonen zustande. Aufgrund der gleichzeitig eintretenden Schwingungsrelaxation ist die emittierte Strahlung langwelliger als die absorbierte. Dieser Effekt wird Stokes-Verschiebung genannt.^[104]

Fluoreszenzmarker besitzen eine gewisse Anzahl konjugierter Doppelbindungen und aromatischer Ringsysteme, über die sich die π -Elektronen der äußeren Orbitale über einen Großteil der Molekülfläche verteilen. Da hier die Energieunterschiede zwischen den Orbitalen des angeregten Zustands und des Grundzustands so gering sind, dass Photonen des sichtbaren Teils des elektromagnetischen Spektrums zur Anregung der entsprechenden Elektronen genutzt werden können, sind solche Verbindungen für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen optimal geeignet. Grundsätzlich gilt, je mehr konjugierte Doppelbindungen im Molekül vorhanden sind, umso niedriger ist die benötigte Anregungsenergie und umso größer ist die Wellenlänge der Anregungsstrahlung. Gleichzeitig steigt die Effizienz der emittierten Strahlung (Quantenausbeute) mit der Anzahl der π -Bindungen. Durch die Auswahl bestimmter Filter wird bei der Fluoreszenzmikroskopie sichergestellt, dass nur das emittierte Licht beobachtet wird, wobei Auflösungen bis auf molekulare Ebene erreicht werden können. Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie basiert auf dem linearen Effekt der Fluoreszenz: Die Absorption eines Photons durch das Fluorophor bewirkt die Emission eines Photons durch Fluoreszenz. Wird die Intensität der anregenden Strahlung um den Faktor Zwei erhöht, wird dadurch doppelt so viel Fluoreszenz erzeugt. Im Gegensatz dazu basiert die Mehrphotonenfluoreszenzmikroskopie auf nichtlinearen Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Materie. Um Fluoreszenz durch einen Zweiphotonenprozess zu erzeugen, müssen zwei Photonen gleichzeitig vom selben Molekül absorbiert werden. Jedes dieser Photonen besitzt lediglich die Hälfte der Energie, die benötigt wird, um das Molekül in seinen angeregten Zustand zu überführen. Aufgrund der inversen Korrelation von Strahlungsenergie und –wellenlänge besitzen diese Photonen eine etwa doppelt so große Wellenlänge, wie sie zur Einzelphotonenanregung benötigt wird (Abbildung 8).

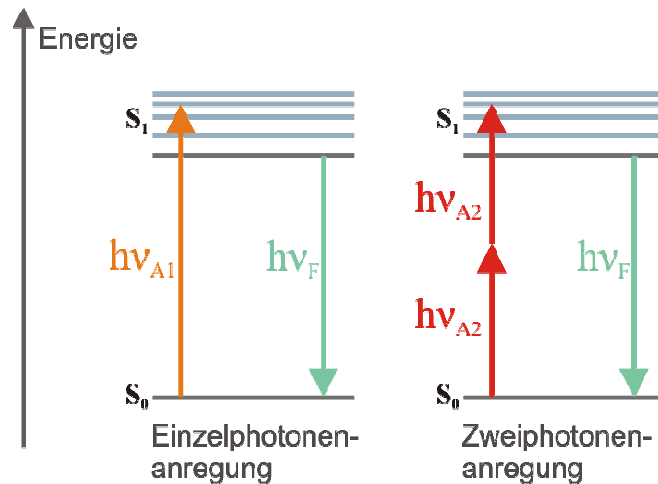


Abbildung 8: Das Jablonski-Diagramm veranschaulicht Einzelphotonenanregung und Zweiphotonenanregung eines Moleküls und anschließende Fluoreszenz.

Aufgrund quantenmechanischer Auswahlregeln unterscheiden sich die Maxima der Zweiphotonenabsorptionsspektren etwas von der doppelten Wellenlänge der maximalen Einphotonenabsorption.[105] In der Praxis ist es jedoch meist ausreichend, für eine Zweiphotonenabsorption mit der Anregungswellenlänge des halben Einphotonenabsorptionsmaximums zu beginnen und die Anregungswellenlänge in diesem Bereich anzupassen, um ein maximales Zweiphotonenemissionssignal zu erreichen.

Im Rahmen von bildgebenden Verfahren verhalten sich durch Zweiphotonabsorption angeregte Moleküle hinsichtlich ihrer Relaxation genauso wie nach Einphotonenanregung und emittieren ein charakteristisches Fluoreszenzsignal. Dies führt bei der Zweiphotonenfluoreszenz zu einer inversen Stokes-Verschiebung, bei der die emittierten Photonen mehr Energie besitzen als die Anregungsphotonen.

Da Zweiphotonenabsorption die simultane Wechselwirkung zweier Photonen mit demselben Molekül voraussetzt, ist ihre Wahrscheinlichkeit sehr gering, unter konventioneller Bogenlampenbeleuchtung sogar praktisch gleich Null. Es müssen daher Lichtquellen herangezogen werden, die eine derart hohe Flussdichte an Photonen auf das zu untersuchende Objekt erzeugen, um Zweiphotonenabsorption zu ermöglichen, ohne es gleichzeitig zu verdampfen. Dies wird durch den Einsatz gepulster Laser gewährleistet, die sehr kurze, intensive Laserpulse mit relativ langen Pausen aussenden.^[106] Die Gesamtenergie der Laserstrahlung wird in so extrem kurzen Zeitintervallen abgegeben, dass seine durchschnittliche Leistung gering bleibt, während der Pulse jedoch eine sehr hohe Photonenflussdichte erreicht wird. Die Wahrscheinlichkeit der Zweiphotonenabsorption ist dabei proportional zum Quadrat der Laserintensität.

Die Fluoreszenzmikroskopie wird meist unter Verwendung eines Konfokalmikroskops eingesetzt und ist besonders für die Untersuchung dünner Proben geeignet. Bei biologischen Studien findet sie häufig Anwendung bei der Sichtbarmachung von Zellbestandteilen. Auch Interaktionen von Proteinen oder die Verfolgung einzelner Vorgänge in lebenden Zellen, wie etwa Studien zur Genaktivität, sind möglich.^[107]

Der entscheidende Vorteil der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie liegt in der deutlich höheren Eindringtiefe. Während die Konfokalmikroskopie bis zu 100 µm in die Probe eindringen kann, sind mit der Zweiphotonenfluoreszenz Eindringtiefen bis zu 1 mm möglich. Obwohl die letztendlich erreichbaren Werte stark von dem vorliegenden Gewebetyp abhängen, kann als Faustregel davon ausgegangen werden, dass durch Zweiphotonenanregung ein sechsfach tieferes Vordringen in die Probe unter Verwendung des gleichen Fluorophors möglich ist. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass zur Zweiphotonenmikroskopie langwelligeres Anregungslicht verwendet wird, welches von biologischem Gewebe schwächer absorbiert wird und somit weniger anfällig für Streueffekte ist. Die geringere Anregungswellenlänge bedingt auch eine verminderte Gefahr phototoxischer Effekte, worunter die strahlungsbedingte Zersetzung von Molekülen wie etwa dem verwendeten Fluorophor zu toxischen Spaltprodukten zu verstehen ist.^[108] Dieses Phänomen wird meist durch kurzwellige Strahlung verursacht. Somit ist die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie die am besten geeignete Methode für *in vivo* Imaging Experimente.

1.6. Fluoreszente Sonden für die Alzheimer-Diagnostik

Sowohl die Fluoreszenz- als auch die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie spielen bei der Alzheimerforschung eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Substanzklassen synthetisiert, die als selektive Fluoreszenzmarker für die biopathologischen Merkmale von AD dienen sollen. An solche Marker werden im Hinblick auf ihre medizinalchemische Anwendung bestimmte Anforderungen gestellt.

Die Anregungswellenlänge sollte nicht zu weit im ultravioletten Bereich liegen, da eine solche Strahlung an zahlreichen Gewebetypen Schäden verursacht oder die bereits erwähnten phototoxischen Effekte auslösen kann. Zu langwellige Strahlung hingegen kann übermäßige Gewebeerwärmungen verursachen. Je nach zu untersuchendem Gewebetyp ist auch eine Autofluoreszenz endogener Fluorophore zu beachten, deren Auftreten den Arbeitsbereich hinsichtlich Absorption und Emission zusätzlich limitiert. Die Stokes-Verschiebung sollte

mindestens 20 nm betragen, damit der Einsatz gängiger Bandpassfilter gewährleistet bleibt. Dabei ist außerdem eine möglichst hohe Quantenausbeute wünschenswert, um ein fluoreszenzmikroskopisches Bild von großer Helligkeit und hohem Kontrast zu erzeugen. Faktoren, die eine Steigerung der Quantenausbeute gewährleisten, sind jedoch anderen medizinalchemischen Aspekten gegenläufig. So bedingt eine möglichst hohe Zahl an π -Bindungen eine entsprechende Molekülgröße. Da bei der Sondensynthese eine *in vivo* Applikation angestrebt wird, muss gewährleistet sein, dass ein Passieren der Blut-Hirn-Schranke seitens der Markierungssubstanzen möglich ist, um Tau-Fibrillen oder A β -Plaques markieren zu können. Bei der Blut-Hirn-Schranke handelt es sich um eine physiologische Barriere, die den Blutkreislauf vom Zentralnervensystem trennt und dieses dadurch vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen und Botenstoffen schützt, gleichzeitig aber auch einen Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ermöglicht. Das Diffusionsvermögen eines Moleküls durch die begrenzenden Zellschichten der Blut-Hirn-Schranke wird vor allem durch seine Lipophilie und Größe bestimmt. Als Richtlinien kann hier die von Christopher Lipinski ermittelten „5er-Regel“ dienen, welche die Voraussetzungen für eine orale Bioverfügbarkeit chemischer Verbindungen angibt.^[109] Danach steht ein hinreichender Anteil eines oral applizierten Wirkstoffes unverändert im systemischen Kreislauf zur Verfügung, wenn dieser

- höchstens fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- höchstens zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- eine Molekülmasse von maximal 500 g/mol
- einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (*log P*-Wert) als Maß seiner Lipophilie von höchstens 5 besitzt.

Um eine hinreichende Gehirngängigkeit einer Substanz zu gewährleisten, ist ein *log P*-Wert kleiner als 3 wünschenswert. Eine meist nicht in vollem Umfang voraussagbare und strukturabhängige Eigenschaft einer verabreichten Substanz ist ihre Pharmakokinetik. Unter diesem Begriff werden sämtliche Prozesse hinsichtlich Resorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion zusammengefasst, denen diese Substanz im Körper unterliegt.

Der Nutzen von Fluoreszenzmarkern in Verbindung mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen für die Alzheimerdiagnostik scheint zunächst nur auf histochemische Anwendungen beschränkt zu sein. Diese stellen allerdings die Grundlage der Entwicklung bildgebender Verfahrenstechniken dar. Viele derzeit im klinischen Einsatz befindlichen PET-Liganden zur *in vivo* Diagnostik von AD basieren auf fluoreszenten Farbstoffen, welche

zunächst histochemisch aufgrund ihrer Fluoreszenz evaluiert wurden. So ist Pittsburgh compound B (PIB) **2** ein Derivat von Thioflavin T **8**, und Methoxy-XO4 **11** leitet sich von Kongorot **9** und Chrysamin-G **10** ab (Abbildung 12).^{[110],[111]}

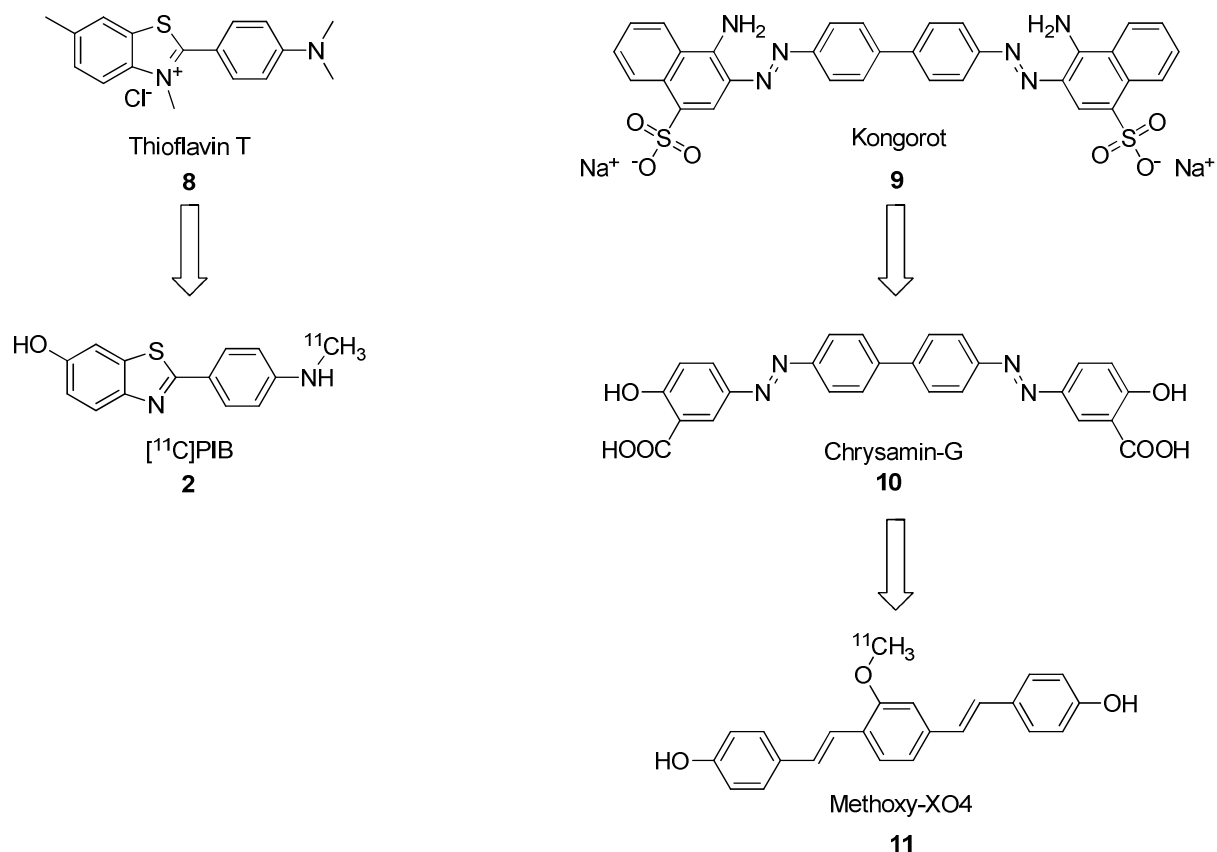


Abbildung 12: Die PET-Marker Pittsburgh compound B (PIB) **2** und Methoxy-XO4 **11** leiten sich von fluoreszenten Farbstoffen ab.

Mittels *in vivo* Zweiphotonenfluoreszenz-Langzeitimaging konnte an transgenen Mäusen (Tg2576), welche eine mutante Form von APP und A β -Plaques exprimieren und mit einem kranialen Fenster ausgestattet sind, aufschlussreiche Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten einzelner amyloider Plaques gewonnen werden. Solchen Mäusen wurde dafür Methoxy-XO4 **11** injiziert und die dadurch markierten Plaques über einen Zeitraum von sechs Wochen beobachtet. Zur Orientierung innerhalb des freigelegten Gehirnareals kann dabei das individuelle Muster an Blutgefäßen genutzt werden, wodurch ein Wiederauffinden einzelner Plaques möglich ist (Abbildung 13).

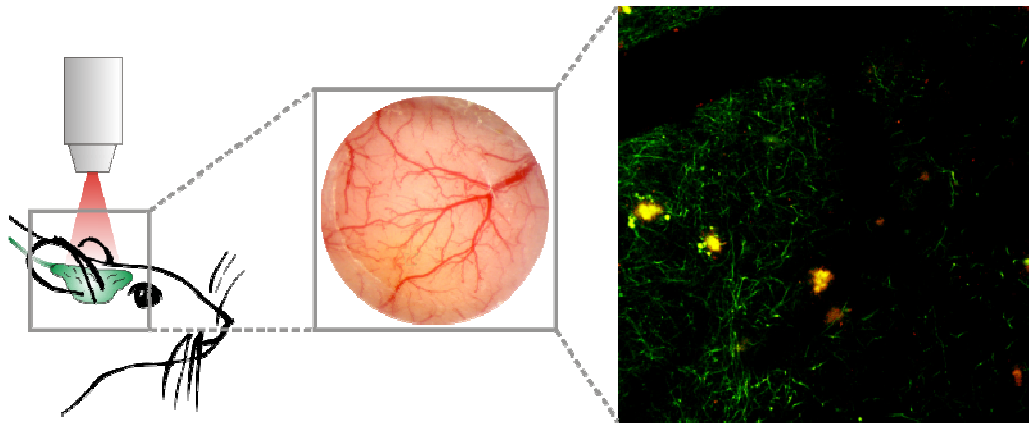


Abbildung 13: Durch *in vivo* Zweiphotonenfluoreszenz-Imaging können einzelne A β -Plaques in transgenen Mäusen über mehrere Wochen beobachtet werden^[112] (*In vivo* Imaging mit **6a** aus Kapitel 3.1.2).

Im Rahmen solcher Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass neu entstandene Plaques anfangs klein sind und während der folgenden Wochen recht schnell wachsen. Nach dieser anfänglichen Wachstumsphase verlangsamt sich das Wachstum drastisch, bis schließlich bei älteren Mäusen kein weiteres Plaquewachstum beobachtbar ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Behandlung, die auf eine Inhibition des Plaquewachstums abzielt, vermutlich in frühen Stadien von AD am effektivsten ist.^[113]

Solche Ansätze für mögliche Fluoreszenz-Imaging-Verfahren am lebenden Patienten erscheinen zunächst nicht denkbar, da kein Verfahren zur Freilegung größerer Hirnareale für diagnostische Zwecke durchführbar ist. Es werden jedoch neue Diagnoseverfahren erprobt, deren Grundlage leichter zugängliche Ausläufer des Gehirns darstellen und dabei ebenfalls von den AD-typischen Pathologien betroffen sind. Diese Verfahren werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.7. Neuartige Diagnoseverfahren

1.7.1. Das Riechepithel

Es ist seit langem bekannt, dass im Verlauf von AD der Geruchssinn der Patienten vermindert ist (Mikrosmie) oder vollständig verschwindet (Anosmie). Dieses Phänomen kann bei 90 % der AD-Patienten beobachtet werden und es gibt Hinweise darauf, dass eine Beeinträchtigung des Geruchssinnes ein Vorbote von MCI oder deren Fortschreiten zu AD sein kann.^{[114],[115]} Ebenso wird berichtet, dass eine Mikrosmie in ihrem Schweregrad bis hin zur Anosmie mit der Schwere einer AD-Pathologie im Gehirn der Betroffenen korreliert.^{[116],[117]}

Olfaktorische Beeinträchtigungen werden auch in Zusammenhang mit zahlreichen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Parkinson,^[118] Chorea Huntington^[119] oder Progressiver Supranukleärer Blickparese^[120] beobachtet. Ebenso wie bei kognitiven Beeinträchtigungen ist es problematisch, die Schwere olfaktorischer Defizite bei Patienten zu quantifizieren. Weiterhin bleibt zu klären, auf welche Art neurologischer Schädigungen diese Defizite zurückzuführen sind.

Die Riechschleimhaut besteht aus Stütz- und Mikrovilli-Zellen sowie aus ausdifferenzierten Stammzellen (Basalzellen). In diese Epithelschicht sind chemosensorische Rezeptorzellen eingebettet. Ihre gebündelten, nichtmyelinisierten Axone erstrecken sich durch das Siebbein zum Bulbus olfactorius (Riechkolben) als vorgelagerten Hirnteil (Abbildung 14).

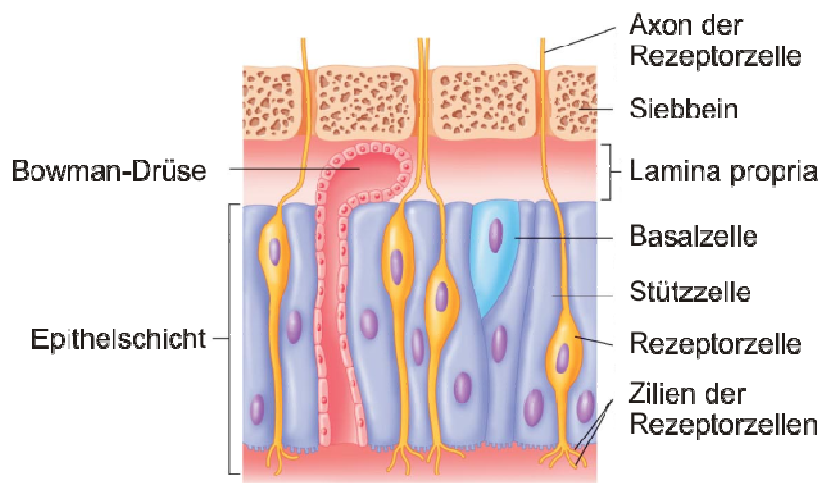


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Riechschleimhaut.

Als Hauptauslöser olfaktorischer Dysfunktion in Zusammenhang mit AD und Morbus Parkinson wird die Anhäufung krankheitsbedingter Läsionen, besonders einer Tau-Pathologie bei AD und einer α -Synuclein-Pathologie bei Morbus Parkinson im Bulbus olfactorius und dem Rhinencephalon (Riechhirn) diskutiert.^{[121],[122]} Die Anzahl der sensorischen Neuronen wird mit zunehmendem Alter infolge von schädigenden Umwelteinflüssen, Entzündungen oder Krankheiten und Alterungsprozessen geringer, ab dem 65. Lebensjahr wird die stärkste Abnahme beobachtet.^[123] Störungen der Riechfunktion im Fall von AD oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen rühren vermutlich von degenerativen Veränderungen verschiedener Bereiche des olfaktorischen Systems her und es ist schwer zu beurteilen, welche Rolle dabei Veränderungen am Riechepithel, am Riechkolben oder an Arealen des Cortex, die der Verarbeitung von Geruchseindrücken dienen, spielen.

Bereits zu Beginn der 1990er Jahre wurde von dystrophen Neuriten (durch Tau-Aggregate geschädigte Axone und Dendriten) in der an das Riechepithel angrenzenden Lamina propria berichtet, die positiv auf eine immunhistologische Taufärbung reagierten.^{[124],[125]} Darauf folgende Studien zeigten jedoch, dass solche dystrophen Neuriten, die ebenfalls Ubiquitin, α -, β - und γ -Synuclein sowie A β exprimieren, auch bei gesunden, älteren Kontrollindividuen und bei Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen gefunden werden konnten.^{[126],[127]} Angesichts dieser vermeintlichen Unspezifität schwand das Interesse an der Entwicklung diagnostischer Verfahren für AD oder andere neurodegenerative Erkrankungen am Riechepithel. Allerdings waren solche frühen Studien nicht sehr zahlreich und betrachteten nur geringe Fallzahlen in der jeweiligen Diagnosegruppe. Eine Verfälschung ihrer Ergebnisse infolge von limitierter Sensitivität und Spezifität der damals zur Verfügung stehenden Reagenzien und Messvorrichtungen ist auch nicht auszuschließen. So ist die krankheitsbezogene Häufigkeit und Spezifität dieser Läsionen bisher ebensowenig etabliert, wie der Grad, zu dem sie mit einer Hirnpathologie oder einer olfaktorischen Dysfunktion korrelieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass A β - und Tau-Ablagerungen häufiger und ausgeprägter bei AD-Patienten beobachtet werden können als bei gesunden gleichaltrigen Kontrollgruppen oder Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen.^[128]

A β -Aggregate wurden hier im Riechepithel hauptsächlich als intrazelluläre zytoplasmatische punktartige, vesikuläre und amorphe Aggregate immunhistologisch nachgewiesen. Dabei muss allerdings betont werden, dass intrazelluläres Amyloid- β in Zusammenhang mit AD kontrovers diskutiert wird, da es hauptsächlich als Bestandteil extrazellulärer Plaques im cerebralen Cortex bei AD-Patienten und in Zusammenhang mit normalen kognitiven Alterungsprozessen beschrieben wird.^{[121],[129]} Zahlreiche Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass diese intrazellulären A β -Aggregate existieren und bei genetischen Varianten von AD,^[130] bei Fällen von Trisomie 21^[131] und transgenen AD-Mausmodellen beobachtet werden.^{[132],[133]} Welche Rolle intrazelluläre A β -Aggregate beim Krankheitsverlauf spielen oder ob sie in ihrer Häufigkeit mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren, konnte bisher ebenso wenig aufgeklärt werden wie ihre genaue Struktur.

Tau-Ablagerungen konnten im Rahmen dieser Studie als typische fibrilläre Strukturen in dystrophen Neuriten innerhalb der Lamina propria und in tieferliegenden Schichten des Riechepithels nachgewiesen werden, hier jedoch in geringerer Häufigkeit. Der Riechnerv und der Riechkolben waren bei allen bestätigten AD-Fällen von einer Tau-Pathologie befallen. Eine Tau-Pathologie zeigt sich bereits in frühen Krankheitsstadien von AD besonders

ausgeprägt im enthorhinalen, perirhinalen und piriformen Cortex.^{[121],[10]} All diese Regionen spielen eine wichtige Rolle bei der Identifikation und der Zuordnung von Geruchseindrücken.^{[134],[135]}

Sowohl für A β - als auch für Tau-Aggregate im Riechepithel wird ein hoher Grad an Korrelation zu einer entsprechenden Pathologie des Cortex genannt, wobei die Übereinstimmung im Falle von A β höher sein soll.^[128] Danach könnte eine Messung beider Biomarker im Riechepithel neue diagnostische Möglichkeiten für AD eröffnen.

1.7.2. Die Retina

Zusätzlich zu kognitiven Beeinträchtigungen und Verhaltensauffälligkeiten werden bei AD-Patienten vermehrt Sehstörungen beobachtet.^[136] Grundsätzlich können Beeinträchtigungen des Sehvermögens in Verbindung mit AD einer Bandbreite von neurologischen Schädigungen zugeschrieben werden, wie etwa Veränderungen des visuellen Cortex sowie Degenerationen präcortikaler Regionen.^[137] Grüner Star (Glaukom) und eine altersbedingte Makuladegeneration sind dabei die häufigsten ophthalmologischen Erkrankungen, von deren vermehrten Auftreten in Zusammenhang mit AD berichtet wird.^[138] So ist beispielsweise der Anteil von AD-Patienten mit Glaucom 2.5 mal höher im Vergleich zu AD-freien Patientengruppen.^[139]

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich inzwischen um die Erforschung eines Zusammenhangs zwischen AD und retinaler Degeneration bemüht. Als Teil des Zentralnervensystems enthält die Retina eine hohe Dichte an Nervenzellen in laminarer Anordnung. Hierbei werden fünf Zelltypen unterschieden: Stäbchen und Zapfen sind Photorezeptorzellen am äußeren Rand der Retina. Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen befinden sich in der angrenzenden inneren nukleären Schicht. Die Axone der Gangliorzellschicht sind gebündelt und bilden den Sehnerv, von wo aus Signale an den visuellen Cortex weitergeleitet werden (Abbildung 15).^[140]

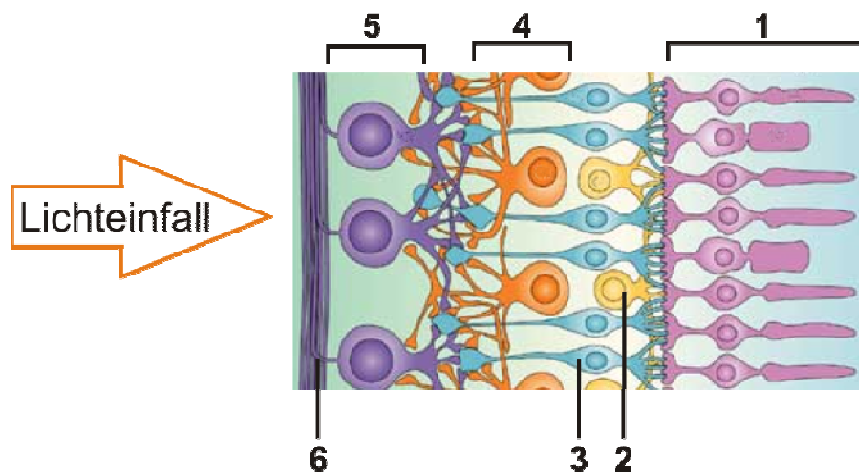


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Retina: 1 Photorezeptorzellen, 2 Horizontalzellen, 3 Bipolarzellen, 4 Amakrinzellen, 5 Ganglienzellen, 6 Axone der Ganglienzellen.^[141]

Im Rahmen von AD werden Veränderungen an der Retina vor allem in Form eines ausgeprägten Verlustes retinaler Ganglienzellen,^[142] einer Dickenabnahme der retinalen Nervenfaserschicht^[143] und eines verminderter retinalen Blutflusses beschrieben.^[137] Verhaltensstudien an transgenen AD Mäusen belegen, dass auch sie von visuellen Dysfunktionen betroffen sind.^[144] Im Vergleich zum Wildtyp wurde bei verschiedenen Linien transgener Mäuse eine verstärkte Immunreaktivität gegenüber APP im Zytoplasma der retinalen Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht beobachtet.^{[145],[146],[147]} Diese Überexpression von APP, die Bildung von löslichem A β und dessen Aggregation zu Plaques führt auch in den Neuronen der Retina zum Zelltod und die Rolle, die A β möglicherweise bei der Hyperphosphorylierung von Tau spielt, führt auch hier zum Verlust der Zellintegrität.^{[148],[149]} So wurden in den verschiedenen Retina-Zellschichten wie der retinalen Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren plexiformen Schicht sowie der inneren und äußeren nukleären Schicht im transgenen Mausmodell hyperphosphorylierte Tau-Aggregate gefunden, die mit A β -Aggregaten in Verbindung zu stehen scheinen.^[147]

Neueste Studien, in denen Veränderungen an der Retina bei transgenen Mausmodellen untersucht wurden, berichten von einer veränderten Prozessierung von APP und einer Anhäufung von A β -Peptiden in Neuronen der retinalen Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass diese im Mausmodell beobachteten pathophysiologischen Veränderungen womöglich denen von AD-Patienten ähneln. Durch die Injektion von anti-A β -Antikörpern in transgene Mäuse konnte ein Rückgang von A β -Aggregaten sowohl in der Retina als auch im Gehirn beobachtet werden.^[150] Eine weitere immuntherapeutische Studie zeigte, dass APP_{swe}/PS1 Δ E9 transgene Mäuse, die mit einem

veränderten, Myelin-verwandten Protein immunisiert wurden, einen Rückgang von A β -Plaques in der Retina und im Gehirn zu gleichen Ausmaßen zeigten.^[151]

Die Retina kann somit im weitesten Sinne als ein vereinfachtes Modell des Gehirns betrachtet werden, insofern als dass pathologische Veränderungen und therapeutische Strategien, die an der Retina beobachtbar oder anwendbar sind, die entsprechende Situation im Gehirn angemessen widerspiegeln. Der laminare Aufbau der Retina erleichtert dabei die Erforschung krankhafter Veränderungen erheblich. Obwohl sie insgesamt aus zehn Schichten aufgebaut ist, sind retinale Neuronen nur in drei dieser Schichten angeordnet. Jede Abnormität innerhalb dieser Zellschichten könnte eine pathologische Indikation des Gehirns widerspiegeln. Die Transparenz des Auges sollte demnach eine Visualisierung und Verfolgung progressiver Veränderungen einer A β -Pathologie ermöglichen. Die systemische Injektion von Curcumin in lebende APP_{swe}/PS1 Δ E9 transgene Mäuse (7.5 mg/kg/Tag) ermöglichte eine hochaufgelöste und nichtinvasive Visualisierung retinaler A β -Plaques.^[151] Trotz dieser recht hohen Dosierung scheint eine Übertragung auf den Menschen theoretisch möglich. In einer randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie wird Curcumin bei einer Dosis von 12 g/Tag als unproblematisch beschrieben.^{[152],[153]}

Auch Tau-bedingte Veränderungen scheinen bei einer Retinadegeneration eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte bei Glaukom-Patienten eine verminderte Konzentration an nicht-phosphoryliertem Tau in der Retina beobachtet werden, welche mit einer vermehrten Ablagerung von hyperphosphoryliertem Tau im Sehnerv einherging.^[154] Zusätzlich ging aus Studien mit transgenen Drosophila-Linien, dass retinale Neuronen anfällig für eine A β - und Tau-bedingte Neurodegeneration sind.^{[155],[156]}

Bei transgenen Mäusen (P301S) wurde nachgewiesen, dass eine Expression einer mutanten humanen Tau-Form eine Axonopathie sowie die Bildung von hyperphosphorylierten Tau-Filamenten in der retinalen Ganglienzellschicht auslöst.^[157] Ein Nachweis dieser Tau-Aggregate erfolgte *in vitro* sowohl immunhistologisch durch Antikörperfärbung (AT100), als auch durch den Fluoreszenzfarbstoff FSB.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die Möglichkeit gegeben zu sein, durch ophthalmologische Untersuchungen diese degenerativen Veränderungen auch *in vivo* detektieren zu können. Seitdem wird die Untersuchung AD-bedingter retinaler Degeneration als vielversprechender Weg für die Erforschung einer Alzheimer-Pathologie und möglicher therapeutischer Ansätze angesehen. Die Entwicklung hochauflösender ophthalmologischer

Imaging-Techniken für eine frühzeitige Diagnose von AD und zur Verfolgung von Therapieansätzen durch direkte Visualisierung der Retina erscheint vielversprechend und bietet attraktive Perspektiven im Hinblick auf Kosten und Zeitaufwand.

2. Zielsetzung

Wie im vorangegangenen Kapitel geschildert, existiert derzeit keine Möglichkeit, die Alzheimer'sche Krankheit anhand ihrer pathologischen Merkmale im Gehirn lebender Patienten sicher zu diagnostizieren. Zur Verfügung stehenden Visualisierungstechniken sind aufgrund infrastruktureller Anforderungen und hoher Kosten der breiten Öffentlichkeit nicht zugänglich. Außerdem mangelt es ihnen an Genauigkeit oder an Markierungssubstanzen, die sich durch eine hinreichende Selektivität und Bioverfügbarkeit auszeichnen. Basierend auf diesen Sachverhalten standen für dieser Arbeit folgende Forschungsschwerpunkte im Vordergrund, welche im Rahmen des Teilprojekts „*Molekulare Sonden*“ des Verbundprojekts „*Molecular Diagnosis of Neurodegenerative Diseases in the Eye*“ (MINDE) bearbeitet werden sollten:

- Auf der Suche nach Markierungssubstanzen für die biopathologischen Merkmale der Alzheimer'schen Krankheit sollten verschiedene fluoreszente Substanzklassen synthetisiert werden.
- Zur Bestimmung der physikochemischen und biochemischen Grundlagen für die Sondenselektivität und diagnostische Effizienz in zellfreien Systemen sollten diese Markierungssubstanzen im Rahmen histologischer Untersuchungen an humanem AD-geschädigten Hirngewebe zunächst auf ihre Eignung hin untersucht werden, Tau-Fibrillen bzw. A β -Plaques selektiv anzufärben. Diese qualitative Evaluation sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen.
- Die aus den histochemischen Experimenten gewonnen Ergebnisse sollten im Rahmen weiterführender Affinitätsbestimmungen quantifiziert werden. Diese Grundlagenforschung sollte den iterativen Prozess aus rationalem Design, Synthese und Analyse neuartiger Sonden für das β -Amyloid- und Tau-Aggregate ermöglichen. Dabei sollten fluoreszente Sonde folgende physikochemischen Eigenschaften erfüllen:
 - $\log P$ 1-2.8, dieser Lipophilieparameter erhöht die potentielle Hirngängigkeit bei reduzierter Bindung an weiße Hirnmasse und reduziert die Plasmaprotein-Bindung
 - *topological polar surface area* < 70Å², dies erhöht die potentielle Hirngängigkeit
 - Ladungsfreiheit bzw. schwache Basizität für gute Penetration der Blut-Hirnschranke

- hohe Blut-Hirnschranken-Penetration: Gehirn/Plasma > 1/10.
Alternativ: nasale Applikation
 - gute Photostabilität (geringe Photobleichung) durch kurzlebige Singulettanregung versus langlebiger Triplettanregung
 - Molmasse < 500 g/mol
 - Absorption 1-Photonenspektroskopie 400 - 450 nm oder 520 - 600 nm wegen der Eigenfluoreszenz der Linse zwischen 450 - 520 nm
 - Absorption 2-Photonenspektroskopie 400 - 450 nm oder 520 - 750 nm
 - Stokes-Verschiebung > 20 nm
 - Emission 420 - 450 nm oder 520 - 1000 nm (therapeutischer Bereich 600-1000 nm)
 - Extinktionskoeffizient $\epsilon > 10.000$
 - Extinktionszunahme bei Bindung an das Zielprotein > 10x, zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber der freien Sonde.
 - Halbwertszeit *in vivo* > 60 min
 - Eignung für multimodale molekulare Bildgebung: PET/UV-VIS für erhöhte Präzision und Informationsdichte
 - optionale ^{18}F -, ^{11}C - oder ^{125}I -Markierung. Diese Option kann die Probenvalidierung im Tiermodell und später am Mensch um mehrere Monate verkürzen und erlaubt den direkten Vergleich gegen die diagnostische Leistung der aktuellen PET-Probe PIB.
- Die als affin und selektiv identifizierten Marker sollten in Tiermodellen auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften und auf ihre Eignung als *in vivo* Imaging-Marker untersucht werden.
 - Durch weiterführende histochemische Experimente sollten die synthetisierten Marker für die Erforschung neuartiger, nichtinvasiver Diagnoseverfahren verwendet werden.
 - Außerdem sollten Inhibitoren für die Glykogen-Synthetase-Kinase 3 β (GSK3 β) synthetisiert werden.

3. Allgemeiner und kumulativer Teil

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vorgestellt. Zunächst werden die Strategien erläutert, welche bei der Entwicklung neuer fluoreszenter Liganden für die Diagnose der Alzheimer'schen Krankheit angewendet wurden. Im Anschluss daran werden die synthetisierten Substanzklassen und die Ergebnisse ihrer Evaluation in Modellen der Alzheimer'schen Krankheit vorgestellt.

3.1. Fluoreszente Sonden für die Diagnostik von Morbus Alzheimer

3.1.1. Strategien für die Entwicklung neuer fluoreszenter Sonden

Für das Auffinden neuer fluoreszenter Sonden für die Markierung von Tau-Fibrillen oder amyloiden Plaques sind mehrere Strategien denkbar.

Ein Ansatzpunkt besteht darin, dass bereits etablierte Liganden als Leitstruktur dienen und diese dann durch strukturelle Variationen hinsichtlich ihrer Affinität, Selektivität oder Pharmakokinetik so verändert werden, dass eine entsprechende Optimierung dieser Eigenschaften erzielt wird. Dieses Konzept wird in der Wirkstoffentwicklung sehr häufig angewendet.

Eine andere Möglichkeit liegt in der Beobachtung begründet, dass gewisse Molekülklassen aufgrund funktioneller Gruppen oder größerer Strukturmodule bereits eine Affinität zu den favorisierten Targets gezeigt haben, allerdings im Rahmen anderer medizinisch-chemischer Forschungsbereiche. So ist davon auszugehen, dass Moleküle, welche sich beispielsweise als Inhibitoren der Tau- oder A β -Aggregation erwiesen haben, eine grundlegende strukturbedingte Affinität zu diesen Proteinen aufweisen. Um sich diese Affinität bei der Entwicklung fluoreszenter Marker zu Nutze zu machen, können solche Moleküle mit zusätzlichen fluoreszenten Resten ausgestattet oder strukturell so derivatisiert werden, dass beispielsweise durch Ringschlüsse oder Aromatisierung von Molekülbereichen eine Fluoreszenz resultiert.^[93]

Beide beschriebenen Strategien sowie deren Kombination wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der Entwicklung neuer fluoreszenter Sonden für die Diagnose der Alzheimer'schen Krankheit angewendet.

3.1.2. Bis(arylvinyl)pyrazine, -pyrimidine -und pyridazine als Imaging-Substanzen für Tau-Fibrillen und amyloide Plaques in Modellen der Alzheimer-Demenz

Der Inhalt dieses Kapitels wurde im Mai 2012 bei der Fachzeitschrift *Journal of Medicinal Chemistry* (ACS Publications) zur Veröffentlichung eingereicht.

Titel: Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines and -pyridazines as Imaging Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models

Autoren: Alexander Boländer, Daniel Kieser, Constantin Voss, Silvia Bauer, Christian Schön, Steffen Burgold, Tobias Bittner, Jana Hölzer, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech, Henner Knust, Robert Berger, Jochen Herms, Ingrid Hilger und Boris Schmidt.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wird die Synthese und diagnostische Evaluation von Bis(arylvinyl)pyrazine, -pyrimidine und -pyridazine in Modellen der Alzheimer-Demenz beschrieben. Die strukturelle Motivation dieser Substanzen ist auf Curcumin-abgeleitete Isoxazole und Pyrazole, die sich bereits als wirkungsvolle Inhibitoren der Tau-Aggregation erwiesen haben, sowie auf den etablierten Fluoreszenzmarker Methoxy-XO4 **11** zurückzuführen.^{[158],[111]} Aufgrund der entwickelten Synthesemethoden konnte ein breites Spektrum an Liganden hoher struktureller Variabilität erhalten werden. Die Affinitätsbestimmung zu Tau-Fibrillen und amyloiden Plaques erfolgte histochemisch und im Rahmen eines neu entwickelten Verdrängungsassays mit dem Referenzfarbstoff Thiazinrot®. Anhand der so ermittelten Affinitätsdaten konnten Informationen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen gewonnen werden. Ausgewählte physikochemische Parameter, welche durch das Substitutionsmuster der Liganden bedingt werden, wurden für ihre Korrelation mit den Affinitätsdaten berechnet. Es konnten Tau-selektive Marker ermittelt werden, wobei die Hirngängigkeit eines Markers *in vivo* im transgenen Mausmodell mit kranialem Fenster anhand von Zweiphotonenfluoreszenzimagining bestätigt werden konnte. Weiterhin gelang durch histochemische Untersuchung die Identifikation von Tau-Aggregaten in den Bowman-Drüsen der Riechschleimhaut von AD-Patienten, wodurch neue Möglichkeiten einer endoskopischen Diagnose von AD am lebenden Patienten anhand dieser pathologischen Merkmale eröffnet wurden.

Beitrag A. Boländer: Synthese von **5a-h**, **6b-e**; histochemische Färbungen mit **5a-h**, **6b-e**; Datenanalyse Histologie, Affinität und Toxikologie

Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines and - pyridazines as Imaging Agents for Tau Fibrils and β - Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models

Alexander Boländer,[†] Daniel Kieser,[†] Constantin Voss,[†] Silvia Bauer,[†] Christian Schön,[‡] Steffen Burgold,[‡] Tobias Bittner,[‡] Jana Hölzer,[§] Roland Heyny-von Haußen,[‡] Gerhard Mall,[‡] Valérie Goetschy,[∞] Christian Czech,[∞] Henner Knust,[∞] Robert Berger,[†] Jochen Herms,[‡] Ingrid Hilger,[§] and Boris Schmidt^{,†}*

[†]Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany, [‡]DZNE site Munich and Center of Neuropathology Ludwig- Maximilians- Universität, 81377 Munich, Germany, [§]Institute of Diagnostic and Interventional Radiology I, Experimental Radiology, Universitätsklinikum Jena, 07747 Jena, Germany, [‡]Department of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany, [∞]F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

KEYWORDS: Alzheimer's disease, fluorescent probes, imaging agents, medicinal chemistry, polarizability.

ABSTRACT: The *in vivo* diagnosis of Alzheimer's disease (AD), is of high socioeconomic interest and remains a demanding field of research. The biopathological hallmarks of the disease are extracellular plaques consisting of aggregated β -amyloid peptides and tau protein derived intracellular tangles. Here we report the synthesis and evaluation of fluorescent pyrazine, pyrimidine and pyridazine derivatives *in vitro* and *in vivo* aiming at a tau-based diagnosis of AD. The probes were pre-evaluated on human brain tissue by fluorescence microscopy and were found to label all known disease related alterations at high contrast and specificity. To quantify the binding affinity, a new thiazine red displacement assay was developed and selected candidates were toxicologically profiled. The application in transgenic mouse models demonstrated bioavailability and brain permeability for one compound. In the course of histological testing, we discovered an AD related deposition of tau aggregates in the Bowman's glands of the olfactory epithelium, which hold potential for an endoscopic diagnosis of AD in the olfactory system.

Introduction

With approximately 36 million people worldwide suffering from dementia and with that number expected to grow to 115 million by 2050, Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia among older adults.¹ There is no cure for the disease to date and a distinct diagnosis can be carried out by postmortem examination only, when the biopathological hallmarks of AD are detectable in human brain tissue. These are two notorious protein aggregates: extracellular plaques mainly consisting of two β -amyloid peptides $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, and intracellular tangles resulting from the aggregation of abnormally hyperphosphorylated tau protein to paired helical filaments. Both deposits are considered to impair intra- and interneuronal reaction cascades causing progressive neurodegeneration almost decades before first signs of cognitive impairment

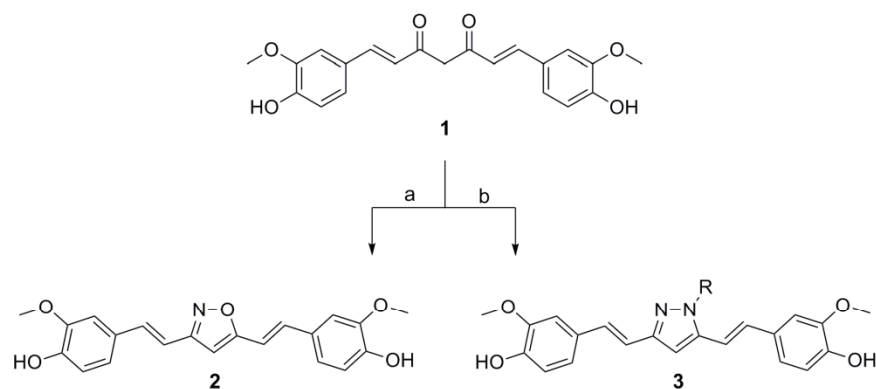
emerge.² It was shown that the load of tau fibrils in brain tissue correlates far more accurately to the severity of dementia, whereas there are several reports for amyloid plaque-burden at autopsy, yet no signs of cognitive impairment during lifetime.³ Nevertheless both deposits remain the most important targets for *in vivo* imaging of disease progression. Especially PET (positron emission tomography) and SPECT (single photon emission computed tomography) are under constant further development with respect to new radiolabeled markers to visualize the pathology. [¹¹C]PIB is the most prominent and most frequently applied PET tracer to visualize A β *in vivo*.⁴

The disadvantage of these techniques lies in the necessary infrastructure ruling out a widespread applicability. The insufficient ability of the markers to discriminate between tau and A β limits them to A β detection. In the course of ligand design tau targeting probes have emerged more slowly than amyloid- β probes. This may be due to the still overwhelming interest in A β . Therefore tau-directed probes are needed. On the basis of histological staining of tau fibrils and A β plaques, we sought non-toxic fluorescent dyes of high photostability and a high affinity to tau over A β , easy to handle and applicable in biological and histological staining.

Results and Discussion

We reported on curcumin-derived isoxazoles **2** and pyrazoles **3** as highly affine ligands for fibrillar A β ₄₂ aggregates and as potent inhibitors of tau aggregation recently (Scheme 1). These results suggest a fundamental affinity of these compounds to tau deposits *in vitro*.⁵ The same rationale was exploited to arrive at the tau ligand TH-2.⁶

Scheme 1. Synthesis of curcumin-derived isoxazoles **2** and pyrazoles **3**.



a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, pyridine, EtOH, reflux. b) RNHNH_2 , MeOH, NEt_3 , rt / RNHNH_2 , TFA, toluene, reflux.⁵

Curcumin **1** itself is currently used in imaging studies and led to the identification of A β plaques in the mouse retina, yet requires high intravenous dosage of curcumin which is deemed toxic for humans.⁷ Unfortunately the fluorescence of isoxazoles **2** and pyrazoles **3** is low and their derivation from curcumin **1** imposes limits on the substitution pattern of their phenylenevinylene flanks. Structurally, they resemble the benchmark ligand for A β plaques *in vivo* fluorescence microscopy methoxy-XO4 **4** (Figure 1) which is also used for A β -PET imaging as its ^{11}C -labeled radioisomer but displays insufficient pharmacokinetics, non-ideal single-photon excitation in tissue and very slow clearance ruling out a clinical application.⁸⁻¹⁰

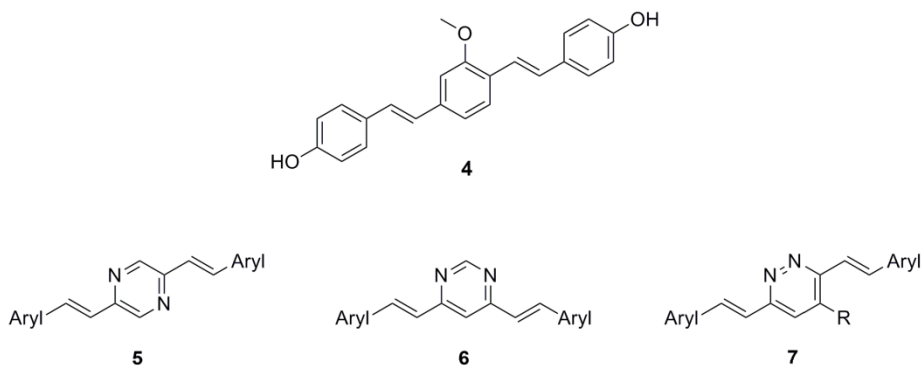
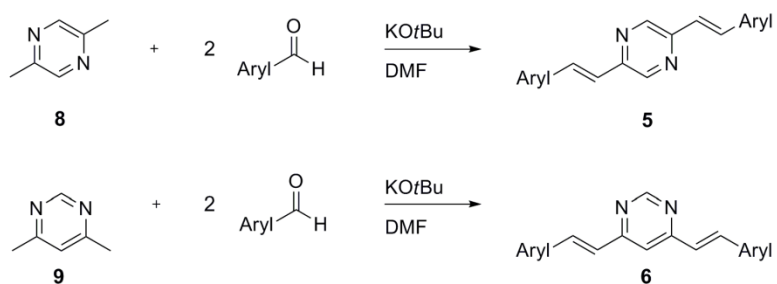


Figure 1. methoxy-XO4 **4**, bis(arylvinyl)pyrazines **5**, -pyrimidines **6** and -pyridazines **7**

The replacement of the anisole core of **4** by pyrazine, pyrimidine or pyridazine as aromatic cores with a high electron-withdrawing character and significant aromaticity should lead to molecules with high conjugation length and permits a large structural variability within the flanks of the molecule. This allows for an improvement of physicochemical properties by introducing functional groups affecting lipophilicity and fluorescence. Herein we describe the synthesis of bis(arylvinyl)pyrazines **5**, -pyrimidines **6** and -pyridazines **7** (Figure 1), and their histological and toxicological evaluation with respect to AD-pathology aiming at an *in vivo* diagnosis of AD associated protein deposits.

The styryl scaffold of **5** and **6** is formed in an atom efficient reaction by the condensation of aromatic aldehydes, and dimethylpyrazine **8** or dimethylpyrimidine **9** according to a slightly modified published procedure (Scheme 2).¹¹

Scheme 2. Synthesis of bis(arylvinyl)pyrazines **5** and -pyrimidines **6**

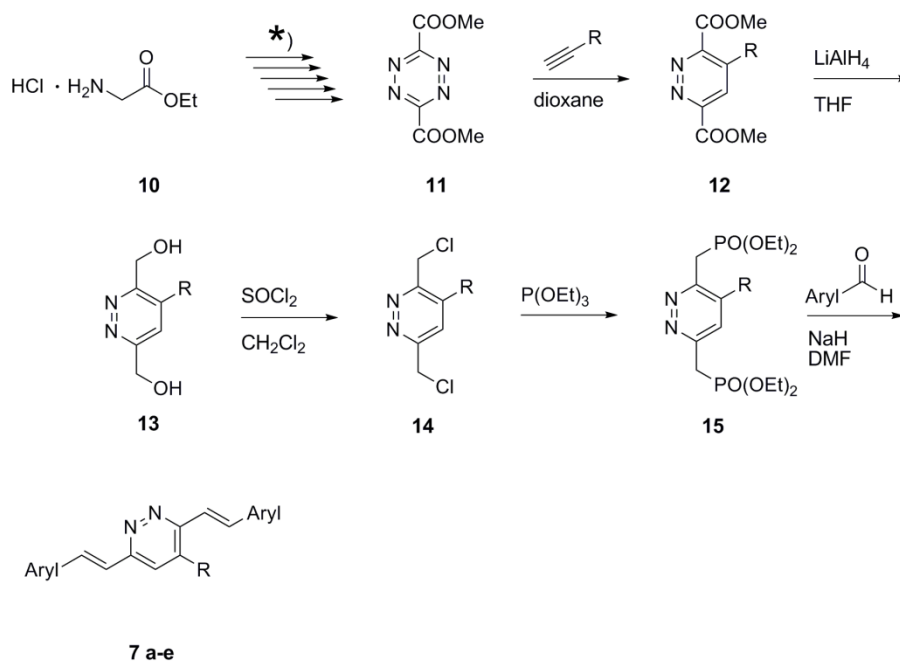


The selectivity was sufficiently high to generate *all-trans* isomers within the limits of NMR detection by the coupling constant for the vinylic protons in the ^1H -NMR spectra (J ca. 16 Hz).

The products obtained are listed in Table 1.

The synthesis of the bis(arylvinyl)pyridazines **7** was carried out via a ten step synthesis (Scheme 3).

Scheme 3. Synthesis of bis(arylvinyl)pyridazines **7**



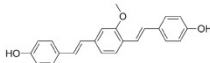
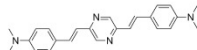
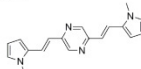
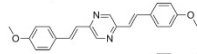
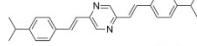
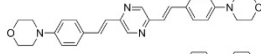
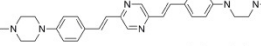
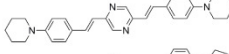
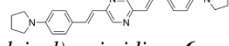
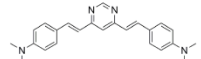
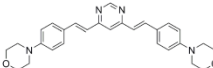
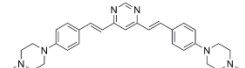
*)Five step synthesis of tetrazinedimethoxycarboxylate **11** according to a published procedure¹² and further five step conversion of **11** to bis(arylvinyl) pyridazines **7 a-e**

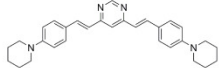
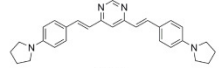
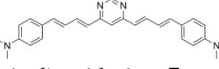
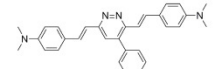
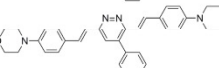
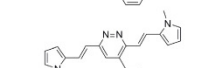
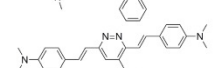
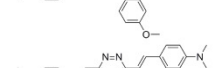
Starting from glycine ethylester **10**, tetrazinedimethoxycarboxylate **11** was obtained according to a strategy reported for **12** (R = phenyl).¹² The diversity of the aromatic substituent R on the pyridazine **12** was introduced by a subsequent Diels-Alder reaction with inverse electron demand utilizing **11** and various alkynes to provide novel derivatives.

Reduction of the diester **12** and conversion of the resulting dialcohol **13** yielded 3,6-bis(chloromethyl)pyridazine **14**. From the latter resulted diphosphonate **15** which underwent a

Horner-Wadsworth-Emmons reaction with aromatic aldehydes to yield the desired bis(arylvinyl)pyridazines **7 a-e** (Table 1).

Table 1. Synthesized bis(arylvinyl)pyrazines **5**, -pyrimidines **6** and -pyridazines **7** and methoxy-XO4 **4** with determined affinities, spectroscopical data and polarizability

compound	IC ₅₀ (nM) ^a		cLogP ^b	λ _{abs} ^{max} (nm)	λ _{abs} ^{max} (nm)	λ _{em} ^{max} (nm)	α' (a ₀ ³) ^d
	Tau	Aβ					
<i>methoxy-XO4 4</i>							
	246	140	5.35				
<i>Bis(arylvinyl)pyrazines 5</i>							
5a 	<i>n.m.</i> ^e		4.10	405	453	570	507
5b 	<i>n.m.</i> ^c		1.38	435	420	544	362
5c 	13	17	3.89	380	414	486	421
5d 	<i>inactive</i>		6.29	375	403	457	455
5e 	6	43	2.87	380	448	564	560
5f 	42	51	3.12	390	454	556	608
5g 	<i>n.m.</i> ^e		5.29	385	454	574	585
5h 	<i>n.m.</i> ^e		4.66	416	458	565	568
<i>Bis(arylvinyl)pyrimidines 6</i>							
6a 	4	54	4.54	430	428	575	462
6b 	<i>inactive</i>		3.32	380	424	538	517
6c 	7469	2381	3.56	405	427	552	563

6d		17	156	5.73	414	429	576	540
6e		2	52	5.10	440	434	581	522
6f		2	3	5.68	450	476	587	635
Bis(arylvinyldiazine) 7								
7a		<i>inactive</i>		6.13	411	455	537	559
7b		4707	7591	4.91	365	448	535	614
7c		<i>inactive</i>		3.41	409	429	509	419
7d		1591	4571	5.96	410	453	534	580
7e		1251	10066	6.19	415	457	535	560

^aIC₅₀ values were determined in a thiazine red displacement assay as replicates.¹³ ^bcalculated cLogP values¹⁴ ^ccalculated absorption maxima¹³ ^dcalculated static electronic polarizability volume $\alpha' = \alpha / (4\pi\epsilon_0)$ ¹³ ^en.m.: not measurable due to spectral overlap with the reference compound thiazine red

For all compounds we calculated¹³ the absorption maxima and determined the absorption and emission maxima in solution. In a preliminary *in vitro* study the synthesized dyes were applied to human brain tissue with AD pathology.¹⁵ The affinity to tau fibrils and A β plaques was evaluated qualitatively by fluorescence microscopy.¹³ All of the tested compounds showed good to excellent staining of both tau fibrils and A β plaques at high contrast, low background staining and high photostability in accord with immunohistochemical staining applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb for tau deposits and Amyloid A4 for A β plaques (Figure 2 A-D).

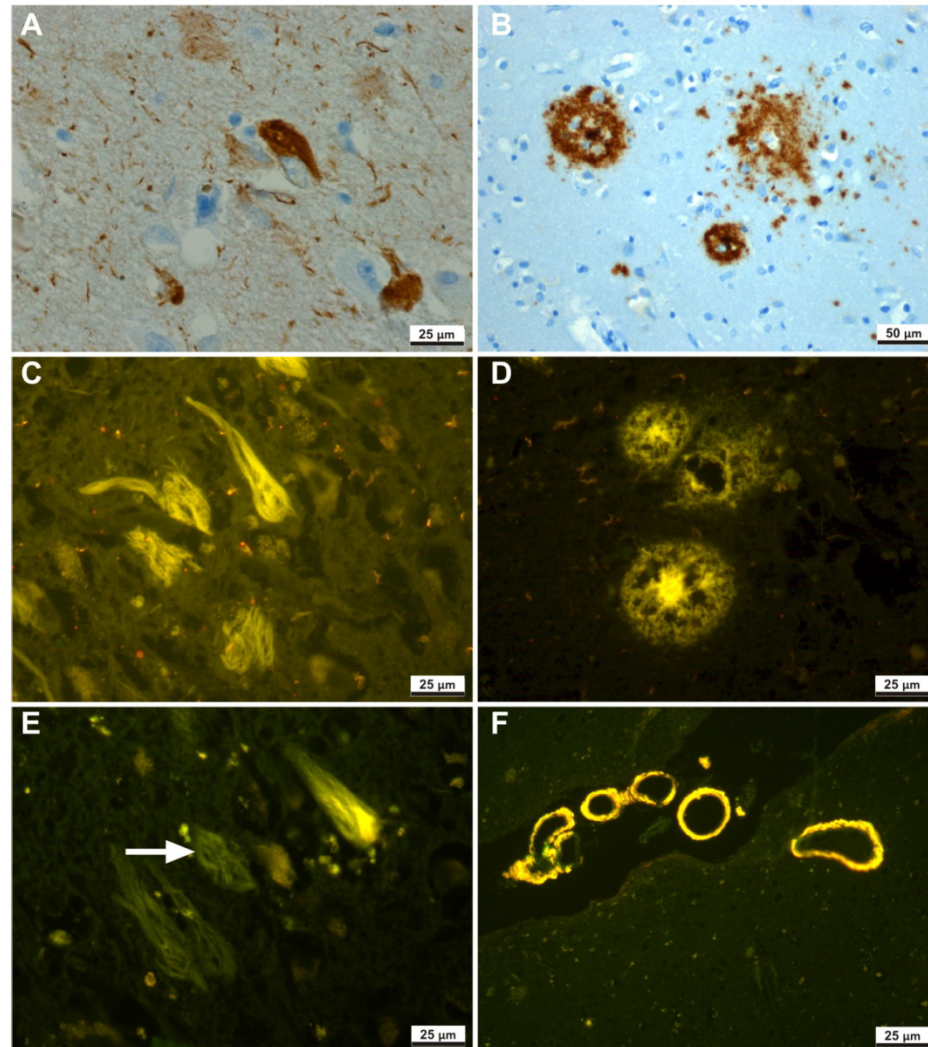


Figure 2. AD related deposits on human brain tissue, **top:** immunohistologically stained tau fibrils with antibody AT8 mAb (A) and Aβ-Plaques with antibody Amyloid A4 (B), **middle:** Tau fibrils (C) and Aβ-Plaques (D) stained with **5a**, **bottom:** Intracellular tau tangle and extracellular tau tangles (arrow-marked) (E) and Aβ-angiopathy (F) stained with **5a**¹⁵

Though staining with antibodies is still the generally accepted benchmark to evaluate new imaging markers, antibodies often display a lack of sensitivity. AT8-staining fails to detect up to 38 % of neurofibrillary tangles.¹⁶ Especially so-called ghost tangles, which are released from affected neurons after cell-degeneration and are typical of late stages of AD do not show any positive immune-tau-staining.¹⁷ Indeed the detection of ghost tangles is of high interest if it comes to a *post-mortem* classification of the stage of AD at hand. They may be identified by immunostaining of ubiquitin, a polypeptide, which is also a part of neurofibrillary tangles. Since ubiquitin is expressed in all eukaryotic cells, it is not a specific indicator though.¹⁸ Our ligands stain both intracellular fibrillar threads of tau and apparent extracellular aggregates of tau (Figure 2 E). In addition to extracellular A β plaques, brain matter affected by AD pathology harbors additional amyloid deposits within the vascular walls of blood vessels called A β -angiopathies, which are also considerably stained by our dye **5a** (Figure 2 F).¹⁹ Thus all AD related pathological protein deposits can be stained using our dyes in a one-time procedure and can be detected easily by fluorescence microscopy. One example is provided in Figure 2. For additional examples see supporting information.

Histological *in vitro* staining experiments provide little information on absolute affinities and are not directly comparable with respect to prospective *in vivo* imaging. Thus we developed a new *in vitro* affinity assay to determine the IC₅₀ values versus thiazine red displacement from aggregated tau and A β ₄₀.¹³ Thiazine red was selected as reference marker because it was previously shown to be an accurate marker for β -pleated sheet structures and to reliably stain A β plaques, tau fibrils and diffuse neurofibrillary tangles (K_d for aggregated tau = 18 nM, K_d for aggregated A β = 49 nM).^{13, 16, 20, 21} We evaluated the established A β marker methoxy-XO4 **4** in this assay. ¹¹C-labeled methoxy-XO4 was reported to display an affinity of K_i = 26.8 nM to

aggregated amyloid- β_{40} in a displacement assay versus unlabeled methoxy-XO4 **4**.⁸ In our assay it turned out to be a much weaker ligand in competition to thiazine red, displaying an IC_{50} of 140 nM on $A\beta_{40}$. All IC_{50} values are listed in Table 1. Almost all of our compounds show higher affinity to aggregated tau than to $A\beta_{40}$, except for **6c**. Even though methoxy-XO4 **4** is considered a selective amyloid marker, we could only determine a 1.8-fold higher affinity to $A\beta$ over tau. It is reported that the relative amounts of amyloid and tau deposits require a 20- to 50-fold higher selectivity towards tau to allow *in vivo* detection of tau. Compounds that do not reach this threshold are limited to the detection of tau in the enthorhinal cortex.²² If it comes to tau selective markers, **6e** meets this criterion. **6a** has a comparable tau affinity, however it is just 13.5-fold higher than its $A\beta$ affinity. Caveat: This selectivity was observed in *in vitro* assays which may not reflect the physiological situation *in vivo*.

A distinct structure-activity-relationship cannot be deduced from the affinity results. The variable substituents of the tested molecules do not solely account for a probe's affinity, though a trend can be observed indicating that *N*- or *O*-containing substituents in *para* position on the aromatic flanks drastically increase affinity. Nevertheless they do not guarantee high affinity; both shape and size of the entire molecule seem to provide an equipollent influence: **5e** shows a very high affinity to aggregated tau (IC_{50} = 6 nM) and a moderate to $A\beta_{40}$ (IC_{50} = 43 nM). Its angular isomer **6b** shows no notable affinity to tau or $A\beta_{40}$ at all. **7b** has a nearly linear equilibrium structure in its electronic ground state, the additional phenyl ring on the pyridazine core buckles the angle between the 4-morpholinostyryl-branches marginally, but significantly enlarges the size of the molecule, which seems to strongly diminish its target affinity (aggr. tau IC_{50} = 4707 nM, aggr. $A\beta_{40}$ IC_{50} = 7591 nM). This observation is valid for all tested bis(arylvinyl)phenylpyridazines **7**. They all show an extremely low target binding. Where a

direct comparison is possible, bis(arylvinyl)pyrazines **5** show higher affinities than their bis(arylvinyl)pyrimidine isomers **6**. On the other hand angular bis(arylvinyl)pyrimidines **6** can show high to excellent affinity, especially **6a**, **6e** and **6f**. As a general correlation between substitution pattern and affinity does not seem to exist, we tried to correlate affinities to physicochemical parameters, starting with the calculated cLogP values (Table 1). We clearly emphasize that these values are obtained from calculations based on specific algorithms for calculating cLogP from fragment-based methods and can differ from experimental determinations by two powers of ten.¹⁴ (For methoxy-XO4 **4** the calculated cLogP value is 5.35 whereas the experimentally determined is reported as 2.6).⁸ The plotting of the cLogP values against the IC₅₀ values indicates a lack of exploitable correlation.¹³

Besides, polarizability has been proposed as a descriptor for tau binding affinity within individual scaffold families.²³ Inspired by these results we calculated the static electronic polarizabilities α' of our compounds (Table 1) and plotted them against the corresponding IC₅₀ values.¹³ Again, there is no significant correlation between affinity and polarizability of this ligand series to tau and amyloid- β .¹³ Due to the poor correlation of both cLogP and static electronic polarizability α' to both tau and amyloid- β affinity, neither parameter seems useful for further improvement of our markers. Since **6a** and **6e** show the highest affinity to aggregated tau (**6a**: IC₅₀ = 4 nM, **6e**: IC₅₀ = 2 nM) over a moderate A β affinity (**6a**: IC₅₀ = 54 nM, **6e**: IC₅₀ = 52 nM), we decided to test both compounds *in vivo*. After the toxicological evaluation in human liver carcinoma cell lines Hep G2 did not show any significant decline in cell vitality, we evaluated selected candidates *in vivo* in a transgenic mouse model.^{13, 24} However recent *in vivo* studies and histological staining experiments indicate severe discrepancies between labelling experiments of human and murine tau, which refers to significant conformational differences

between the two and suggests the absence of the appropriate ligand binding sites on transgenic murine tau versus human tau aggregates.^{25, 26} Thus we relied on the A β affinity of both ligands to determine the brain permeability and bioavailability in a transgenic mouse model overexpressing A β (APP_{swe}PS1 Δ E9) and equipped with a cranial window. While **6e** did not show any positive results, A β plaques were very well detectable with **6a** in the mouse brain by *in vivo* fluorescence microscopy 4 hours after injection of 2 mg/kg (Figure 5A). Counterstaining with methoxy-XO4 **4** was performed in the same mouse 2 days later by the additional injection of 2 mg/kg and confirmed the results as the areas stained by **6a** were overlayed by the areas stained by **4** (Figure 5B).

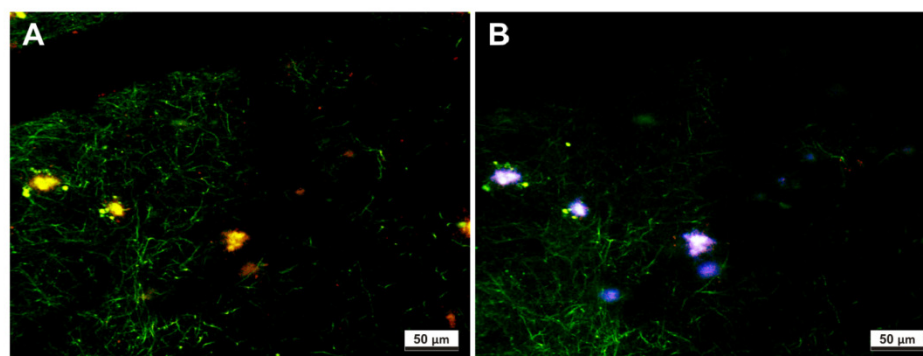


Figure 5. **A** Detection of A β plaques stained with **6a** in APP_{swe}PS1 Δ E9 transgenic mouse model (2 mg **6a**/kg intraperitoneal injection (ip.) after 4 hours) through cranial window *in vivo*. **B** Counterstaining by additional injection of methoxy-XO4 **4** in the same mouse on day 2 (2 mg **4**/kg ip. after 4 hours)^{13, 24}

The fluorescence properties of **6a** in solution are characterized by a broad excitation range and a remarkable Stokes shift of about 140 nm (Figure 4A). The emission of **6a** after target binding shows a maximum at 510 nm, which enables for an easy distinction from stained lipofuscin

deposits at 570 nm, whose accumulation is also implicated in several neurodegenerative diseases (Figure 6 B-C).²⁷

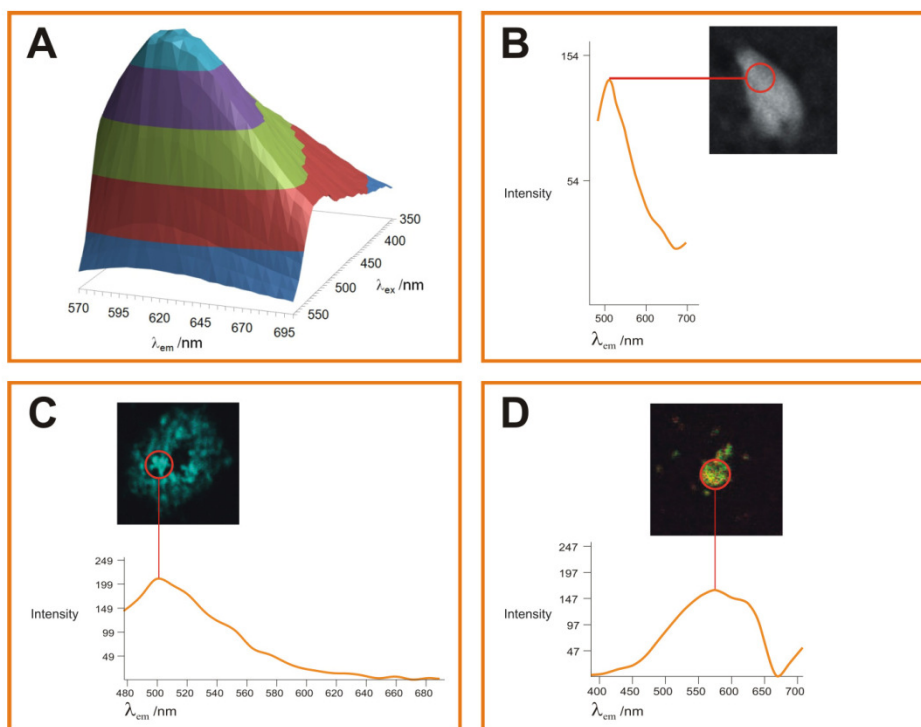


Figure 6. A: 2D-absorption/emission spectra of **6a** (measured in methanol). B-D: *In vitro* on target emission spectra of **6a** on human hippocampal tissue (B: tau fibril, C: $A\beta$ plaque, D: lipofuscin)¹³

Conclusion and Outlook

In summary, we present a series of fluorescent probes for *in vitro* detection of AD associated protein deposits in human brain tissue by fluorescence microscopy offering a broad excitation and emission range by the choice of suitable candidates. Two of these compounds (**6a**, **6e**) even

show a remarkably higher selectivity for aggregated tau, which qualifies for further tau selective imaging techniques with respect to an early onset diagnosis of AD. The ability of **6a** to pass the blood-brain barrier was demonstrated in a transgenic mouse model by the A β binding of that compound *in vivo*. In the course of our histological studies of ligand profiling on human AD-altered brain material, we discovered that certain areas of the olfactory epithelium, which can be considered an extension of the brain actually, harbor tau deposits.^{13, 15} These are the Bowman's glands, which are involved in the production of nasal discharge but also contain nerve tissue (Figure 7 B-D). Our staining results correlated with TAU Ab-3 immunostaining (Figure 7 A) and thioflavin-S-staining (data not shown).

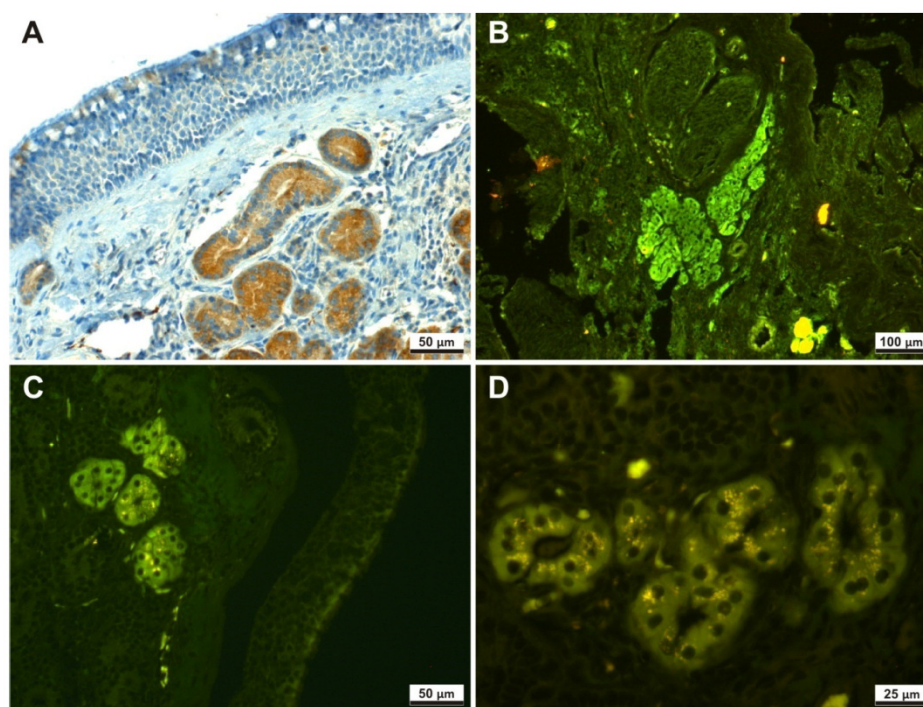


Figure 7. Bowman's glands of the olfactory epithelium containing tau aggregates extracted from a deceased AD patient (88y, Braak V, CERAD C). **A:** immunohistological staining with antibody TAU Ab-3 **B:** stained with **6a** **C-D:** stained with **5a**^{13, 15}

These findings have been confirmed within the investigation of olfactory epithelium tissue of 20 confirmed AD patients (classification analysis: NIA Reagan Institute criteria²⁸) in comparison to 5 healthy controls. The severity of tau load in the Bowman's glands and its correlation to the progress of AD is subject to ongoing investigation. These results hold potential to detect AD related tau deposits endoscopically and therefore noninvasively in the olfactory epithelium. The advantages of such a method compared to imaging techniques based on radiotracers, which require elaborate infrastructure and on-site radiochemical synthesis of suitable tracers is apparent. The applied fluorescent markers for Bowman's gland-imaging should display cell permeability whereas a brain penetration would no longer be necessary, since the olfactory bulb is not confined by the blood-brain barrier. A contamination of the brain by brain-penetrating markers and their metabolites may be avoided, since tracers as methoxy-XO4 **4** clear from the brain extremely slowly and can still be detected 100 days post injection (*pi*) at barely diminished intensity compared to day 1 *pi*.¹⁰

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information.

Tissue probe preparation, immunohistochemical staining, histochemical staining with fluorescent dyes, thiazine red displacement assay, experimental conditions, toxicological evaluation, in vivo imaging in animal models, computational methods and compound

characterization data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Prof. Dr. Boris Schmidt, Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, schmidt_boris@t-online.de

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by the Bundesministerium fuer Bildung und Forschung, Germany (13N10636).

REFERENCES

1. In World Alzheimer Report, 2011.
2. Gandy, S. Perspective: Prevention is better than cure. *Nature (London, United Kingdom)* **2011**, 475, S15.
3. Gravitz, L. Drugs: A tangled web of targets. *Nature (London, United Kingdom)* **2011**, 475, S9-S11.
4. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G.-f.; Estrada, S.; Ausen, B.; Debnath, M. L.;

-
- Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Annals of Neurology* **2004**, *55*, 306-319.
5. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* **2008**, *3*, 165-172.
6. Ono, M.; Hayashi, S.; Matsumura, K.; Kimura, H.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Mori, H.; Saji, H. Rhodanine and Thiohydantoin Derivatives for Detecting Tau Pathology in Alzheimer's Brains. *ACS Chemical Neuroscience* **2011**, *2*, 269-275.
7. Koronyo-Hamaoui, M.; Koronyo, Y.; Ljubimov, A. V.; Miller, C. A.; Ko, M. K.; Black, K. L.; Schwartz, M.; Farkas, D. L. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *NeuroImage* **2011**, *54*, Supplement 1, S204-S217.
8. Klunk, W. E.; Bacskaï, B. J.; Mathis, C. A.; Kajdasz, S. T.; McLellan, M. E.; Frosch, M. P.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Wang, Y.; Hyman, B. T. Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2002**, *61*, 797-805.
9. Sadowski, M.; Pankiewicz, J.; Scholtzova, H.; Tsai, J.; Li, Y.; Carp, R. I.; Meeker, H. C.; Gambetti, P.; Debnath, M.; Mathis, C. A.; Shao, L.; Gan, W.-B.; Klunk, W. E.; Wisniewski, T. Targeting prion amyloid deposits in vivo. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2004**, *63*, 775-784.

-
10. Burgold, S.; Bittner, T.; Dorostkar Mario, M.; Kieser, D.; Fuhrmann, M.; Mitteregger, G.; Kretzschmar, H.; Schmidt, B.; Herms, J. In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta neuropathologica* **2011**, 121, 327-35.
 11. Achelle, S.; Nouria, I.; Pfaffinger, B.; Ramondenc, Y.; Ple, N.; Rodriguez-Lopez, J. V-Shaped 4,6-Bis(arylvinyl)pyrimidine Oligomers: Synthesis and Optical Properties. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3711-3717.
 12. Boger, D. L.; Panek, J. S.; Patel, M. *Organic Syntheses* **1992**, 70, 79-88.
 13. See supporting information for further details.
 14. cLogP values were determined using the OSIRIS Property Explorer <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.
 15. Tissue specimens were obtained with patients' informed consent in the course of regular clinical autopsies performed at the Department of Pathology, Klinikum Darmstadt.
 16. Uchihara, T.; Nakamura, A.; Yamazaki, M.; Mori, O.; Ikeda, K.; Tsuchiya, K. Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. *Acta Neuropathol.* **2001**, 102, 462-466.
 17. Mohorko, N.; Repovs, G.; Popovic, M.; Kovacs, G. G.; Bresjanac, M. Curcumin Labeling of Neuronal Fibrillar Tau Inclusions in Human Brain Samples. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2010**, 69, 405-414.
 18. Bancher, C.; Brunner, C.; Lassmann, H.; Budka, H.; Jellinger, K.; Wiche, G.; Seitelberger, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Wisniewski, H. M. Accumulation of

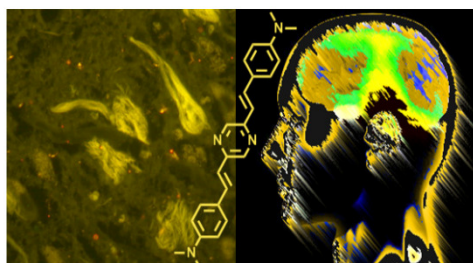
abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research* **1989**, 477, 90-9.

19. Kung, M.-P.; Hou, C.; Zhuang, Z.-P.; Skovronsky, D.; Kung, H. F. Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Research* **2004**, 1025, 98-105.
20. Luna-Munoz, J.; Peralta-Ramirez, J.; Chavez-Macias, L.; Harrington Charles, R.; Wischik Claude, M.; Mena, R. Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints. *Acta neuropathologica* **2008**, 116, 507-15.
21. Mena, R.; Edwards, P.; Perez-Olvera, O.; Wischik, C. M. Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **1995**, 89, 50-6.
22. Schafer Kelsey, N.; Kim, S.; Matzavinos, A.; Kuret, J. Selectivity requirements for diagnostic imaging of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease: a simulation study. *NeuroImage* **2012**, 60, 1724-33.
23. Jensen, J. R.; Cisek, K.; Honson, N. S.; Kuret, J. Ligand polarizability contributes to tau fibril binding affinity. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5147-5154.
24. All procedures were in accordance with an animal protocol approved by the University of Munich and the government of upper Bavaria (Az. 55.2-1-54-2531-188-09).
25. Kolb, H. C.; Walsh, J. C.; Liang, Q.; Duclos, B. A.; Zhang, W.; Scott, P. J. H.; Chen, K.; Gao, Z.; Zhao, T.; Mocharla, V. P.; Kasi, D.; Chen, G.; Wang, E.; Sinha, A.; Xia, C.; Padgett, H. C.; Karimi, F. Preparation of carbazole derivatives and analogs for use as

imaging agents for detecting neurological dysfunction. 2009-US9612009102498, 20090217., 2009.

26. Personal communication H.C. Kolb at Alzheimer's Association International Conference 2011, S4-03-02.
27. Jung, T.; Bader, N.; Grune, T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, 1119, 97-111.
28. Newell, K. L.; Hyman, B. T.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T. Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **1999**, 58, 1147-55.

Table of Contents Graphic



Supporting Information for

Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines and -pyridazines as Imaging
Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in Alzheimer's
Disease Models

Alexander Boländer,[†] Daniel Kieser,[†] Constantin Voss,[†] Silvia Bauer,[†] Christian Schön,[‡]
Steffen Burgold,[‡] Tobias Bittner,[‡] Jana Hölzer,[§] Roland Heyny-von Haußen,[¶] Gerhard Mall,[¶]
Valérie Goetschy,[∞] Christian Czech,[∞] Henner Knust,[∞] Robert Berger,[†] Jochen Herms,[‡] Ingrid
Hilger,[§] and Boris Schmidt^{*,†}

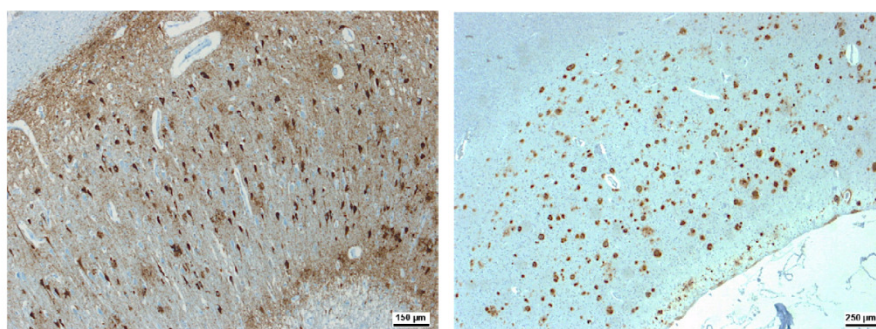
[†]Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt,
Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany, [‡]DZNE site Munich and Center of Neuropathology Ludwig-
Maximilians- Universität, 81377 Munich, Germany, [§]Institute of Diagnostic and Interventional Radiology I,
Experimental Radiology, Universitätsklinikum Jena, 07747 Jena, Germany, [¶]Department of Pathology, Klinikum
Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany, [∞]F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

Tissue Probe Preparation

Human hippocampal tissue fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin was cut to 4 μm sections in a microtome and mounted on standard microscope slides. Subsequent deparaffinization was carried out in xylol (15 min), ethanol 100 % (10 min), ethanol 96% (10 min) and ethanol 70% (10 min). Until subsequent processing the slides were stored in water.

Immunohistochemical Staining

Immunohistochemical staining was performed on 4 μm sections by using a Ventana Benchmark automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ) applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), TAU Ab-3 (Neomarkers, Fremont, CA) and Amyloid A4 (BAM10, Sigma, St. Louis, MO) and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ).



Immunohistochemical staining of tau fibrils (left, antibody AT8 mAb) and A β -plaques (right, antibody Amyloid A4)

Histochemical Staining with Fluorescent Dyes

The staining procedure comprises the following steps of brain section treatment: nucleus staining with acidic haemalm (10 min), blue annealing by water wash-up (5 min), application of the dye solution (2.5 mM) (10 min), ethanol wash-up, water-bath (5 min), 1% acetic acid-bath (15 min), water wash-up and covering with standard glass covers.

Light Microscopy and Fluorescence Microscopy

4 μm sections stained with fluorescence probes were analysed by indirect fluorescence microscopy using an Axioskop microscope with a HBO100 fluorescence illuminator (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the bandpass filter set 09 BP450-490, FT510, LP515, the filter set 02 G365, FT395, LP420 and the filter set 15 BP546, FT580, LP590 (all Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Digital image processing was done with a Leica DFC 300FX fluorescence camera (Leica Microsystems, Heerbrugg, CH) and the software ImageAcces Premium Version 5 (Imagic AG, Galtbrugg, CH).

Thiazine Red R Displacement Assay

Recombinant human microtubule associated tau protein purified from *E.coli* was aggregated at a concentration of 5 μM with arachidonic acid (100 μM) in Tris 10 mM pH8, 24h at 37°C. Synthetic A β_{40} was aggregated at a concentration of 50 μM with arachidonic acid (100 μM) in Tris 10 mM pH8, for three days at 37°C, under shaking at 150 rpm.

thiazine red R was added at the concentration corresponding to the K_d of the respective aggregated protein binding site to induce a fluorescent signal that can be inhibited by the addition of a displacer compound. (K_d for aggregated tau = 18 nM, K_d for aggregated A β = 49 nM).

To determine the affinity of a displacer compound to the *thiazine red R* binding sites of the aggregated proteins, the compound was added at different concentrations to the assay mixture ranging from 0.1 nM to 10000 nM. For the inhibition curve, the compound was measured together with the aggregated proteins and *thiazine red R*. The fluorescence of some dyes overlapped with the fluorescence of *thiazine red R* when measured at 595 nm. Therefore, compounds were also measured together with the aggregated proteins, but without *thiazine red R* (autofluorescence curve) (Figure 1). Net-fluorescence was calculated by subtracting the fluorescence of the wells without *thiazine red R* from the fluorescence of wells containing *thiazine red R* (inhibition curve) (Figure 2). As negative control

S3

thiazine red R and aggregated protein was used. As positive control, *thiazine red R*, reference compound with known activity (see Table 1) and aggregated protein was used.

The assay was performed in Perkin Elmer OptiPlate 384, black, 45 mL assay volume. As assay buffer DPBS (no CaCl₂ no MgCl₂) (GIBCO N. 14020) was used. The tested compounds were dissolved in DMSO and 2 µL of the solution was added to the assay mixture (5% DMSO final). The assay was started by the addition of the aggregated protein (competitive condition). The plates were shortly shaken (1 min with Sterico variomag teleshake) and incubated at room temperature for 30 min. Measurements were performed with En:Vision (Perkin Elmer), at excitation 531 nm / emission 595 nm.

Corresponding IC₅₀ values (inhibitory concentration for 50% decrease) were calculated using the Levenburg Marquardt algorithm:

$$y = A + ((B-A)/(1+((C/x)^D)))$$

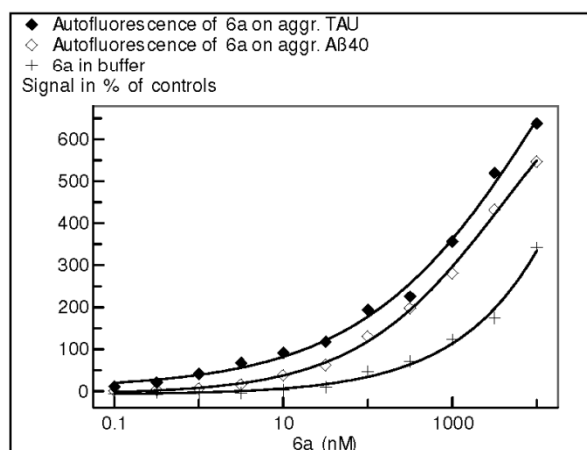
Item	Description
A	The bottom plateau of the curve corresponds to the final minimum y value.
B	The top of the plateau of the curve corresponds to the final maximum y value.
C	The IC ₅₀ value represents the x value at which the half maximum y value is attained.
D	The slope factor. In this model a positive value is returned when y increases with increasing x and a negative value when y increases as x is decreasing.
x	Concentration of the tested compound (nM)
y	Net fluorescence in % of controls.

The obtained values are the average values of replicate experiments. The statistical presentation follows the guidelines laid out by G. Cumming, *J. Cell Biology*, **2007**, 177, 7-11.

Table 1: Determination of IC₅₀ values for different compounds on aggregated proteins using the *thiazine red R* assay. Data represent average of technical replicates.

	aggr. tau - IC ₅₀ (nM)	aggr. Aβ ₄₀ - IC ₅₀ (nM)
Evans Blue	1.0	89
Congo Red	5.4	14
Hondson 1d*	8.8	13
BSB	18	78
MeXO4	246	140
Crystal Violet	1545	1280
FDDNP	1635	1467
IMPY	2707	5671
PIB	3255	5190
AZD2184	9802	>10000
FENE	>10000	>10000
BF-158	>10000	>10000

* Compound Honson 1d from Honson et al, *Neurobiol Dis.* **2007**, 28(3), 251-60.



S5

Figure 1: Fluorescence of **6a** in buffer or in presence of aggregated tau or aggregated A β_{40}

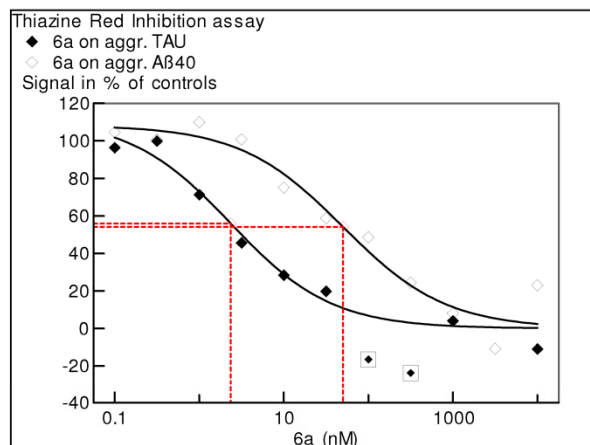


Figure 2: Inhibition curve in *thiazine red R* assay of the compound **6a**, with IC₅₀ determination for aggregated tau and aggregated A β_{40}

Correlation of affinities to physicochemical parameters

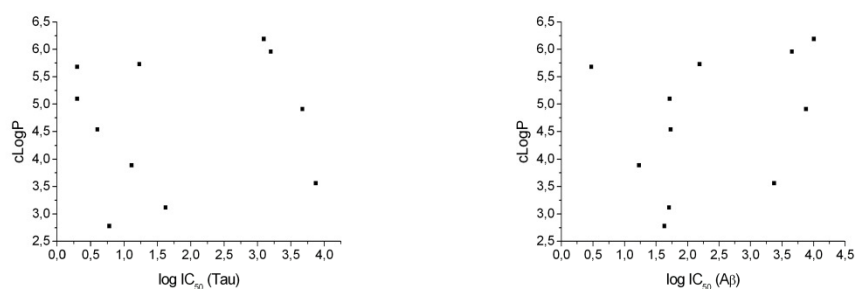


Figure 3: cLogP values plotted against logIC₅₀ values (left:tau, right: A β)

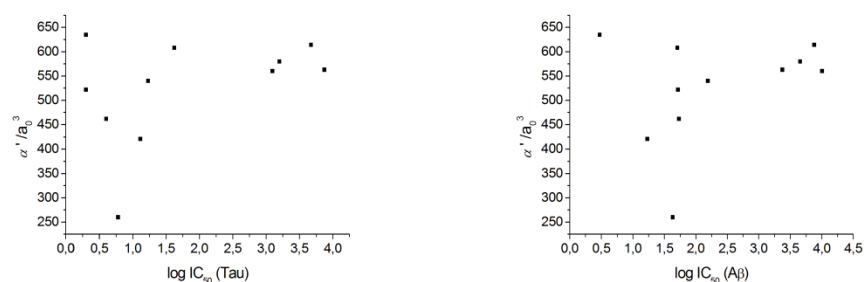


Figure 4: Static electronic polarizabilities α' (a_0^3) plotted against $\log IC_{50}$ values (left: tau, right: A β)

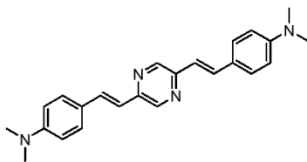
Experimental Conditions

All chemicals were purchased as reagent grade from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise noted. Proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker DRX 500 at 500 MHz and 125.75 MHz respectively at 293 K. The chemical shifts are given in parts per million (ppm) on the delta scale (δ) and are referenced to tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm), ^1H NMR. Abbreviations for NMR data: s = singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; qi = quintet; dd = doublet of doublets; dt = doublet of triplets; dq = doublet of quartets; tt = triplet of triplets; m = multiplet. Mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 magnetic sector spectrometer. Thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck TLC silica gel 60 F 254 (0.2 mm) on Aluminium sheets. Silica gel columns for chromatography were prepared with E. Merck silica gel 60 (0.063-0.20 mesh ASTM). UV/vis-spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrometer, fluorescence spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu RF-1501 Spectrofluorophotometer. 2D fluorescence spectra were recorded on a Tecan Infifite® M1000.

Synthesis of bis(arylvinyl)pyrazines and bis(arylvinyl)pyrimidines

2,5-Dimethylpyrazine (0.125 g, 1.156 mmol) or 4,6-dimethylpyrimidine (0.125 g, 1.156 mmol) was dissolved in 10 mL of dry dimethylformamide, potassium-*tert*-butoxide (0.26 g, 2.312 mmol) was added and the mixture was heated to 80 °C. After 15 minutes, the corresponding aromatic aldehyde (2.312 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 4 hours at 80 °C. After cooling to ambient temperature, the resulting solid was filtered off and washed with ethyl acetate. If necessary, the obtained product was purified by column chromatography.

4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(pyrazine-2,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(*N,N*-dimethylaniline) 5a



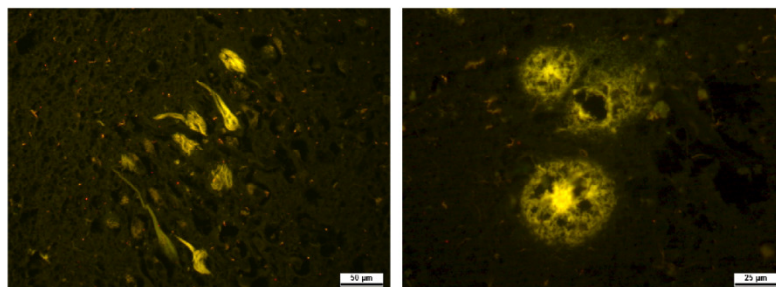
Yield: 86%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.49 (s, 2H), 7.62 (d, *J* = 16 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 6.96 (d, *J* = 16 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 3.02 (s, 12H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 149.7, 148.0, 141.7, 132.8, 127.5, 123.7, 118.7, 111.2, 39.3 ppm.

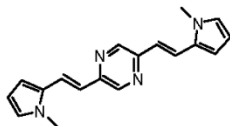
HRMS: calcd. for C₂₄H₂₆N₄: 370.2158, found:370.21641

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **5a**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazine **5b**



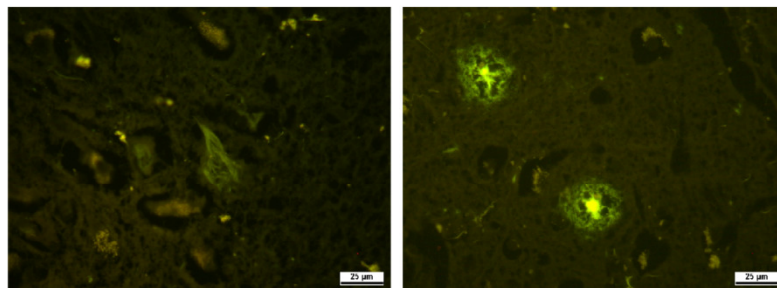
Yield: 89%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.40 (s, 2H), 7.62 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 6.70 (m, 2H), 6.65 (m, 2H), 6.19 (m, 2H), 3.76 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 147.8, 142.1, 130.5, 124.1, 120.6, 119.3, 107.9, 107.8, 33.3 ppm.

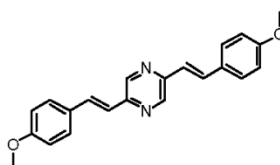
HRMS: calcd. for C₁₈H₁₈N₄: 290.1532, found: 290.15118

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5b**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-methoxystyryl)pyrazine 5c



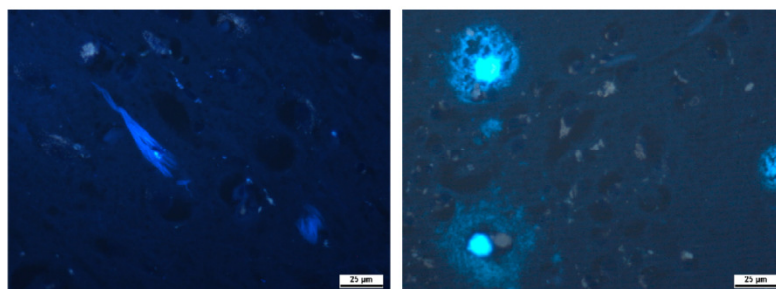
Yield: 80%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.54 (s, 2H), 7.67 (d, J = 16 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.04 (d, J = 16 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 9 Hz, 4H), 3.85 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 158.3, 146.9, 141.0, 131.7, 126.7, 120.0, 112.3, 53.4 ppm.

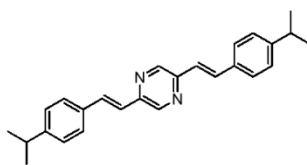
HRMS: calcd. for C₂₂H₂₀N₂O₂: 344.1525, found: 344.15173

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-isopropylstyryl)pyrazine 5d



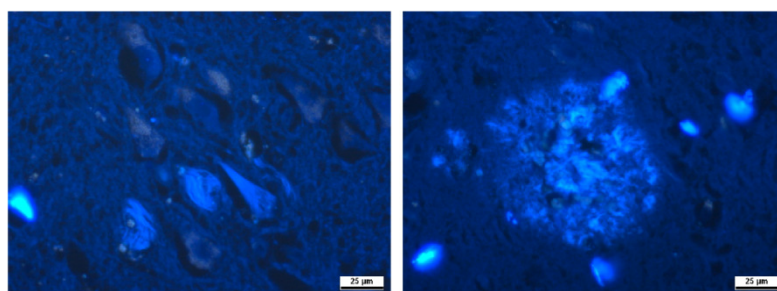
Yield: 86%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.575 (s, 2H), 7.708 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 7.538 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.263 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.136 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 2.938 (o, J = 6.9 Hz, 2H), 1.278 (d, J = 6.9 Hz, 12 H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 149.95, 149.13, 143.14, 134.18, 133.98, 127.33, 126.95, 123.28, 34.02, 23.86 ppm.

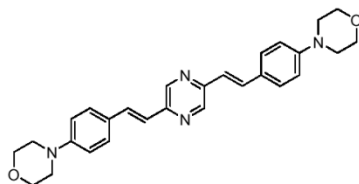
HRMS: calcd. for C₂₆H₂₈N₂: 368.2253, found: 368.22192

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-morpholinostyryl)pyrazine 5e

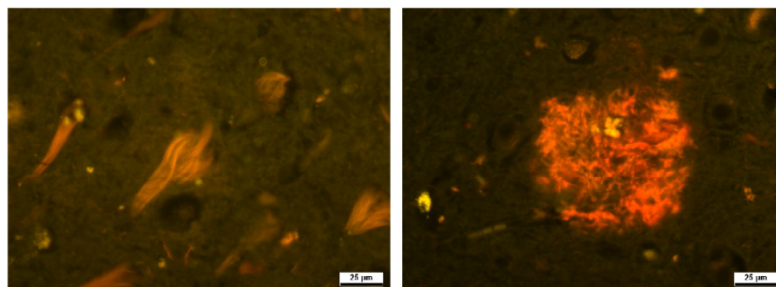


Yield: 79%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.533 (s, 2H), 7.655 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 7.534 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.032 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 6.953 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 3.895 (t, J = 4.8 Hz, 8H), 3.252 (t, J = 4.8 Hz, 8H) ppm.

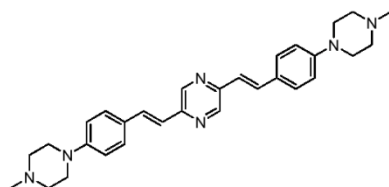
HRMS: calcd. for C₂₈H₃₀N₄O₂: 454.2369, found: 454.2354

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5e**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrazine 5f



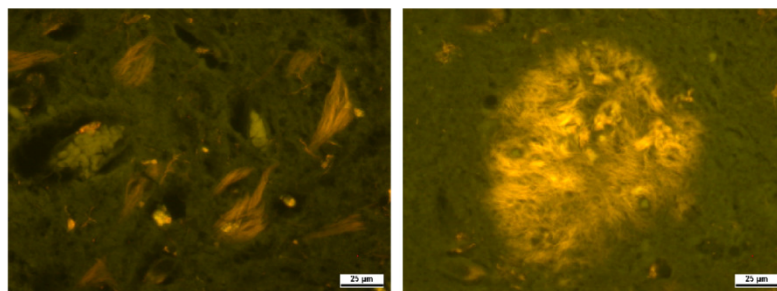
Yield: 83%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.512 (s, 2H), 7.628 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 7.504 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.004 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 6.918 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 3.295 (t, J = 5.0 Hz, 8H), 2.577 (t, J = 5.0 Hz, 8H), 2.360 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 150.41, 148.02, 141.87, 132.62, 127.40, 126.39, 120.05, 114.37, 53.96, 47.29, 45.16 ppm.

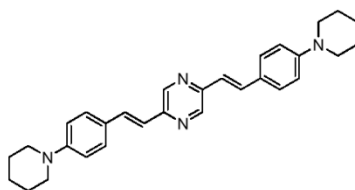
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₆N₆: 480.3003, found: 480.30034

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5f**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrazine 5g



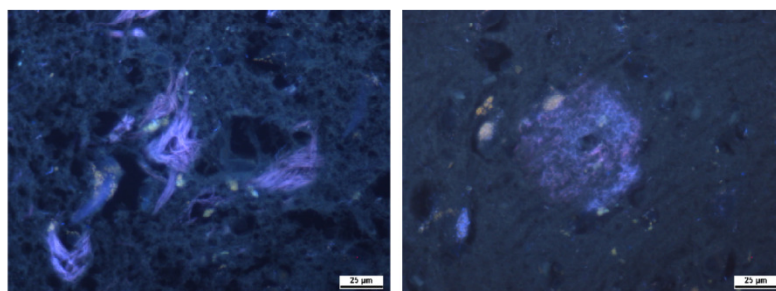
Yield: 79%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.503 (s, 2H), 7.616 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.485 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.986 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 6.912 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 3.256 (t, J = 5.3 Hz, 8H), 1.701 (m, 8H), 1.613 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 152.12, 149.04, 142.82, 133.72, 128.41, 126.67, 120.63, 115.55, 49.68, 25.61, 24.35 ppm.

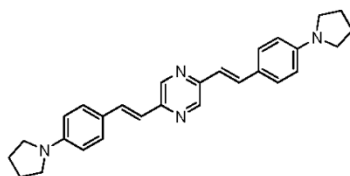
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₄N₄: 450.2784, found: 450.27531

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5g**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrazine 5h



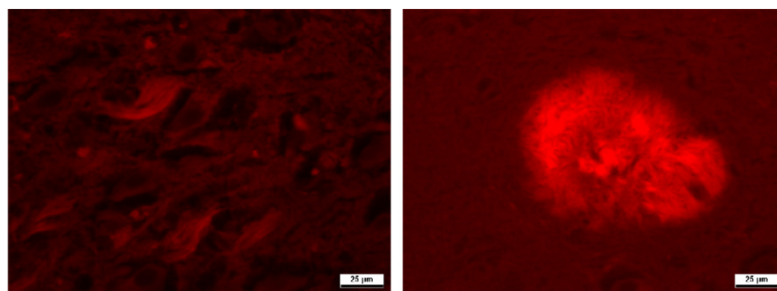
Yield: 82%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.478 (s, 2H), 7.607 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 7.481 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.930 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 6.564 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 3.344 (t, J = 6.6 Hz, 8H), 2.026 (m, 8H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 151.31, 149.01, 142.65, 133.99, 128.69, 123.89, 119.04, 111.76, 47.58, 25.48 ppm.

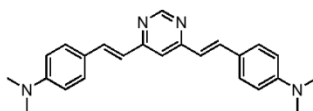
HRMS: calcd. for C₂₈H₃₀N₄: 422.2471, found: 422.24976

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **5h**, filter set 15 BP546, FT580, LP590.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(pyrimidine-4,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) 6a



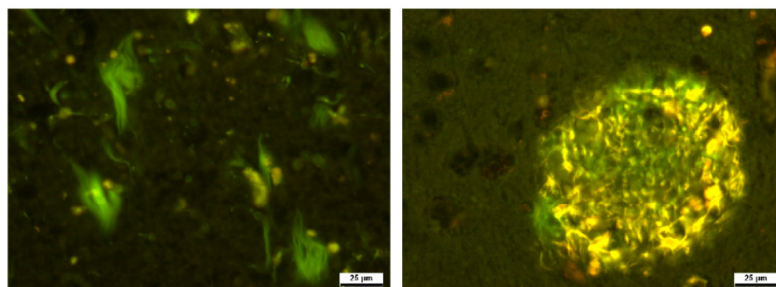
Yield: 89%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.90 (s, 1H), 7.73 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.06 (s, 1H), 6.76 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 2.93 (s, 12H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 163.4, 158.5, 151.5, 137.6, 129.5, 124.2, 121.2, 115.4, 112.4, 40.6 ppm.

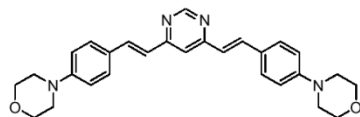
HRMS: calcd. for C₂₄H₂₆N₄: 370.2158, found: 370.21534

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6a**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

4,6-Bis(4-morpholinostyryl)pyrimidine **6b**



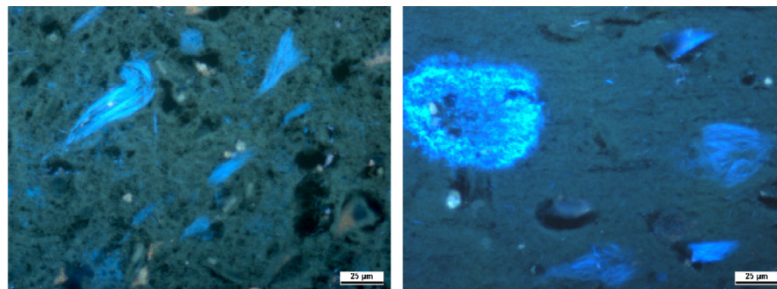
Yield: 88%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 9.027 (s, 1H), 7.821 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.531 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 7.197 (s, 1H), 6.908 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 6.905 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 3.865 (t, 5.0 Hz, 8H), 3.239 (t, J = 5.0 Hz, 8H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 162.96, 158.58, 151.87, 136.55, 128.98, 127.04, 122.80, 115.65, 115.00, 66.73, 48.37 ppm.

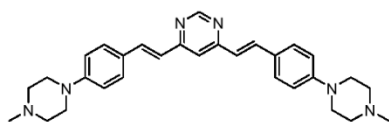
HRMS: calcd. for C₂₈H₃₀N₄O₂: 454.2369, found: 454.23502

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6b**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrimidine **6c**



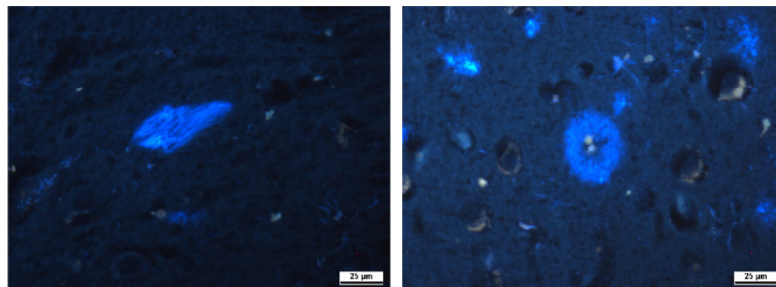
Yield: 84%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 9.015 (s, 1H), 7.810 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.513 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.193 (s, 1H), 6.914 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.893 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 3.301 (t, J = 5.1 Hz, 8H), 2.567 (t, J = 5.1 Hz, 8H), 2.353 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 162.00, 157.57, 150.82, 135.62, 127.95, 125.57, 121.55, 121.23, 114.49, 114.20, 53.92, 47.99, 47.11, 45.16 ppm.

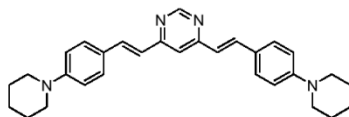
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₆N₆: 480.3003, found:480.29930

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrimidine 6d



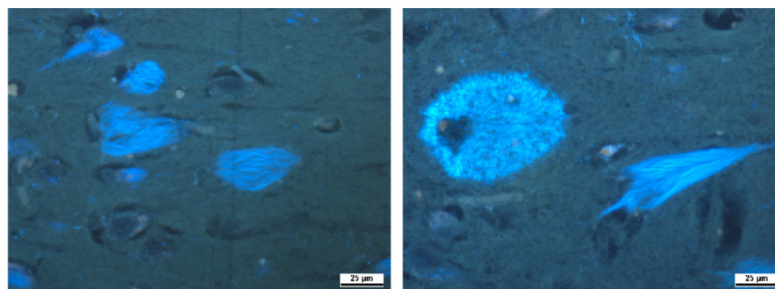
Yield: 92%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 9.004 (s, 1H), 7.803 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.498 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.184 (s, 1H), 6.907 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.876 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 3.273 (t, J = 5.8 Hz, 8H), 1.683 (m, 8H), 1.603 (t, J = 4.1 Hz, 8H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 170.60, 163.05, 158.54, 152.45, 136.75, 128.99, 125.76, 122.04, 115.38, 115.31, 49.46, 25.55, 24.34 ppm.

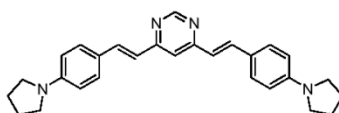
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₄N₄: 450.2784, found:450.27606

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrimidine 6e



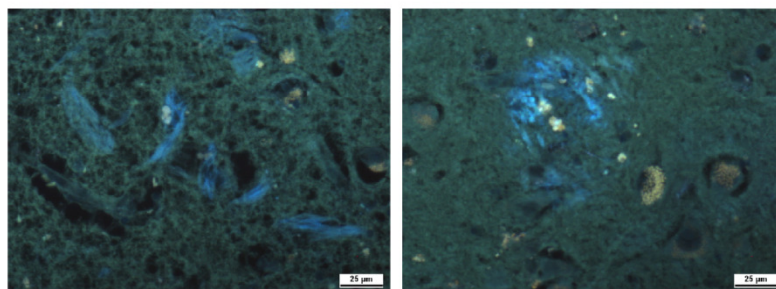
Yield: 86%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.972 (s, 1H), 7.803 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.497 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.144 (s, 1H), 6.818 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 6.560 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 3.342 (t, J = 6.5 Hz, 8H), 2.023 (t, J = 6.5 Hz, 8H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 163.15, 158.48, 148.64, 137.18, 129.30, 123.11, 120.41, 114.99, 111.73, 47.56, 25.48 ppm.

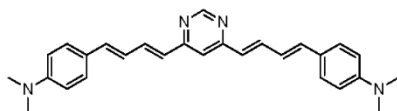
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₄N₄: 422.2471, found:422.24958

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6e**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(1E,1'E,3E,3'E)-4,4'-(pyrimidine-4,6-diyl)bis(buta-1,3-diene-4,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) 6f



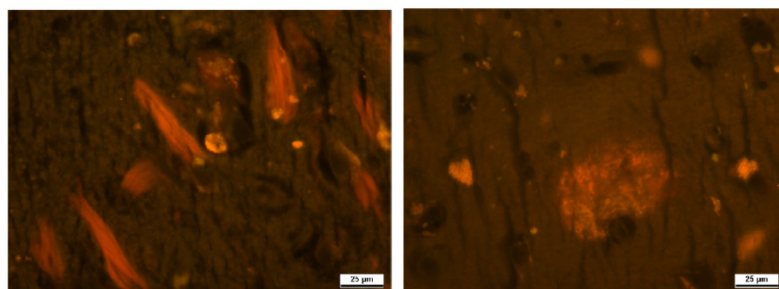
Yield: 73%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.90 (s, 1H), 7.59-7.54 (m, 2H), 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.98 (s, 1H), 6.75 (d, J = 5.1 Hz, 4H), 6.61 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.41 (d, J = 15.1 Hz, 2H), 2.93 (s, 12H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 161.8, 157.5, 149.7, 137.7, 137.2, 127.3, 126.0, 123.9, 122.5, 114.3, 111.2, 39.3 ppm.

HRMS: calcd. for C₂₈H₃₀N₄: 422.2471, found: 422.24540

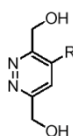
Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6f**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

Synthesis of bis(arylvinyl)pyridazines

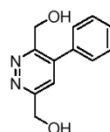
(4-Arylpyridazine-3,6-diyl)dimethanols



R = phenyl, 4-methoxyphenyl, 2-fluorophenyl

(4-Arylpyridazine-3,6-diyl)dimethanols were obtained according to a published procedure for R being phenyl (D. L. Boger, J. S. Panek, M. Patel, *Organic Syntheses* 1992, 70, 79-88).

(4-Phenylpyridazine-3,6-diyl)dimethanol

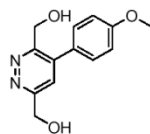


Yield: 51%

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ = 7.52-7.35 (m, 5H), 7.47 (s, 1H), 5.04 (s, 3H), 4.88 (s, 2H), 3.22 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 161.0, 157.5, 140.2, 134.5, 129.6, 129.1, 128.3, 125.1, 63.5, 61.8 ppm.

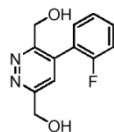
(4-(4-Methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)dimethanol



The raw product was used for the next step without further purification.

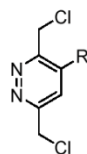
EI-MS: $m/z = 246$ $[M]^+$.

(4-(2-Fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)dimethanol



The raw product was used for the next step without further purification.

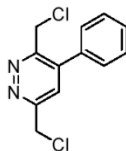
3,6-Bis(chloromethyl)-4-arylpyridazines



R = phenyl, 4-methoxyphenyl, 2-fluorophenyl

To a solution of the corresponding (4-arylpyridazine-3,6-diyl)dimethanol in dichloromethane SOCl_2 (2.5 eq.) was added and the solution was stirred at ambient temperature for 20 minutes, during which its colour changed from brown to dark red. After the addition of water and extraction with dichloromethane the united organic layers were dried over sodium sulfate. The resulting product was used for the next step without further purification.

3,6-Bis(chloromethyl)-4-phenylpyridazine



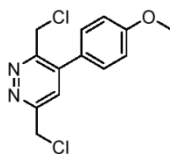
Yield: 30%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 300 K): δ = 7.63 (s, 1H), 7.58-7.45 (m, 5H), 4.94 (s, 2H), 4.84 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): δ = 158.9, 156.8, 141.6, 134.9, 129.6, 129.0, 128.4, 127.1, 44.2, 42.7 ppm.

EI-MS: m/z = 253 $[\text{M}]^+$.

3,6-Bis(chloromethyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyridazine

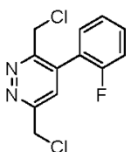


Yield: 35%

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ = 7.60 (s, 4-H), 7.47 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 3.89 (s, 3H) ppm.

EI-MS: m/z = 283 [M]⁺.

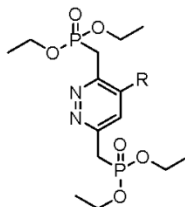
3,6-Bis(chloromethyl)-4-(2-fluorophenyl)pyridazine



The raw product was used in the next step without further purification.

EI-MS: m/z = 271 [M]⁺.

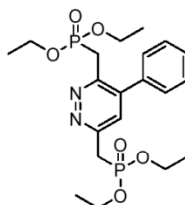
Tetraethyl (4-arylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonates



R = phenyl, 4-methoxyphenyl, 2-fluorophenyl

The corresponding dichloride was dissolved in $\text{P}(\text{OEt})_3$ (100 equiv.) and the mixture was stirred for 18 hours at 110 °C whereupon the colour of the solution changed from dark red to black. After cooling to room temperature, residual $\text{P}(\text{OEt})_3$ was distilled off (high vacuum, 100 °C) and the diphosphonate was obtained as a highly viscous dark oil.

Tetraethyl (4-phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate



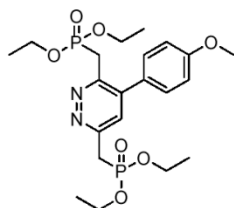
Yield: 92%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): δ = 7.50-7.43 (m, 6H), 4.10 (m, 4H), 4.06 (m, 4H), 3.61 (d, J = 21.9, 2H), 3.60 (d, J = 20.97, 2H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 154.0, 152.9, 141.0, 135.9, 128.99, 128.9, 128.8, 128.0, 62.5 (d, *J* = 136.1 Hz), 62.3 (d, *J* = 136.1 Hz), 33.9 (d, *J* = 136.6 Hz), 31.5 (d, *J* = 136.6 Hz), 16.4-16.2 (m) ppm.

EI-MS: *m/z* = 456 [M]⁺.

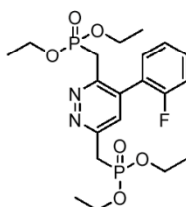
Tetraethyl (4-(4-methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate



Yield: 69 %

EI-MS: *m/z* = 486 [M]⁺.

Tetraethyl (4-(2-fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate



Yield: 88 %

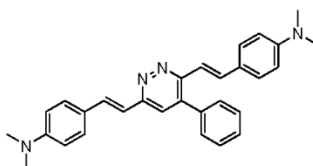
EI-MS: *m/z* = 472 [M]⁺.

S28

Bis(arylvinyl)pyridazines

The corresponding tetraethyl (4-arylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate was dissolved in dry DMF and NaH (4 equiv.) was added. After stirring for 30 minutes, a solution of the corresponding aldehyde (2 equiv.) in dry DMF was added. After stirring for 18 hours, 1 N HCl was added and the mixture was extracted with DCM. The united organic layers were washed with saturated brine, dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated. After column chromatography the products was obtained as colored solids.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) 7a



Yield: 31%

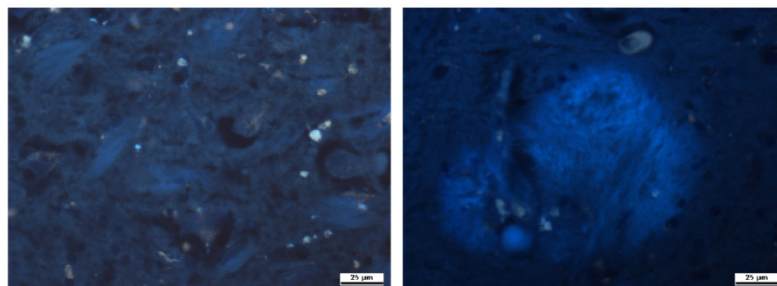
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.05 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.51-7.45 (m, 5H), 7.42 (s, 1H), 7.37 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.02 (s, 6H), 2.98 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 156.1, 153.8, 150.9, 150.7, 138.7, 138.4, 136.9, 135.2, 129.2-128.6 (10-C₂, 17-C₂, 22-C₂, 23-C₂, 24-C), 125.1-124.5 (9-C, 16-C), 123.4, 120.5, 117.4, 112.3-112.1 (11-C₂, 18-C₂), 40.3 (13-C₂, 20-C₂) ppm.

S29

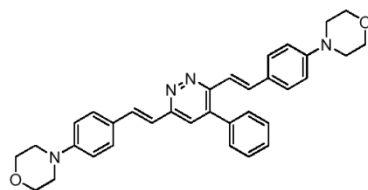
HRMS: calcd. for C₃₀H₃₀N₄: 446.2471, found:446.24664

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **7a**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(4,1-phenylene))dimorpholine **7b**



Yield: 37%

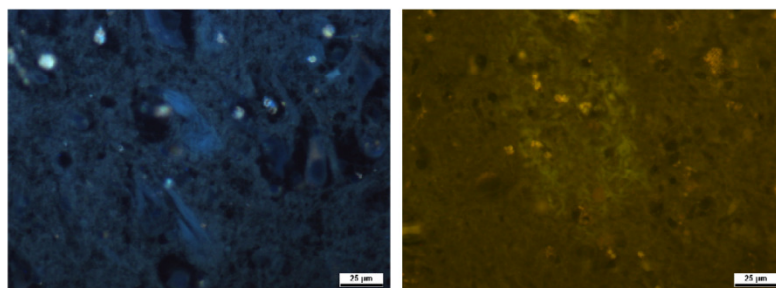
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.06 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.52-7.41 (m, 5H), 7.43 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.86 (m, 8H), 3.23 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.19 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H) ppm.

S30

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 156.1, 153.7, 151.5-151.4 (12-C, 20-C), 138.5, 136.7, 134.8, 133.9, 129.1-128.5 (10-C₂, 18-C₂, 24-C₂, 25-C₂, 26-C), 128.2-127.7 (9-C, 17-C), 123.6, 122.1, 119.1, 115.2-115.1 (11-C₂, 19-C₂), 66.7, 48.6-48.6 (13-C₂, 21-C₂) ppm.

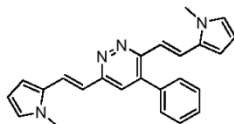
HRMS: calcd. for C₃₄H₃₄N₄O₂: 530.2682, found:530.26589

Histochemical staining:



Tau fibrils (left, filter set 02 G365, FT395, LP420) and Aβ-plaques (right, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515) stained with **7b**.

3,6-bis(4-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)styryl)-4-phenylpyridazine 7c



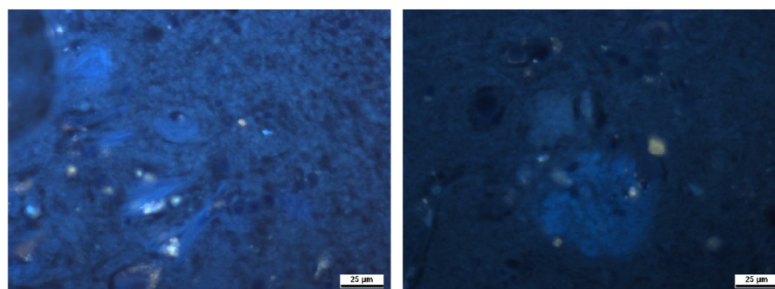
Yield: 39%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.07 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.53-7.44 (m, 5H), 7.23 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.72 (m, 1H), 6.69-6.65 (m, 2H), 6.43 (m, 1H), 6.20 (m, 1H), 6.12 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 155.6, 153.4, 142.7, 136.6, 131.8-131.3 (9-C, 16-C), 129.0, 128.8, 125.2-118.3 (4-C, 7-C, 8-C, 10-C, 14-C, 15-C, 17-C, 24-C), 108.9-108.5 (11-C, 12-C, 18-C, 19-C), 34.3-34.2 (13-C, 20-C) ppm.

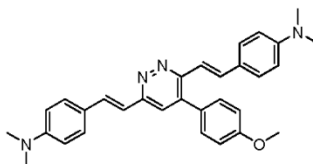
HRMS: calcd. for C₂₄H₂₂N₄: 366.1845, found: 366.18023

Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **7c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(4-methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) 7d



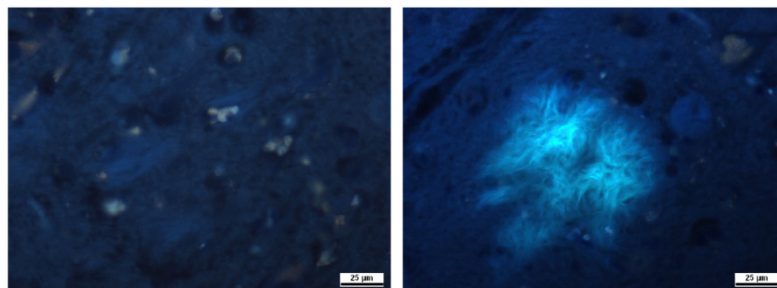
Yield: 36%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.04 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.41-7.36 (m, 5H), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.67 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.02 (s, 6H), 2.99 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 160.0, 156.2, 153.9, 150.8-150.7 (12-C, 19-C), 137.8, 134.8, 133.9, 130.5, 129.2, 128.7-128.5 (10-C₂, 17-C₂), 125.2-124.6 (9-C, 16-C), 123.1, 120.9, 117.9, 114.2, 112.2-112.2 (11-C₂, 18-C₂), 55.4, 40.3 (13-C₂, 20-C₂) ppm.

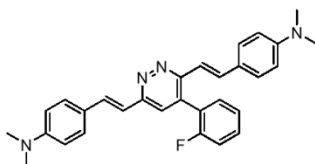
HRMS: calcd. for C₃₁H₃₂N₄O₁: 476.2577, found:476.25247

Histochemical staining:



Tau fibrils fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(2-fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) **7e**

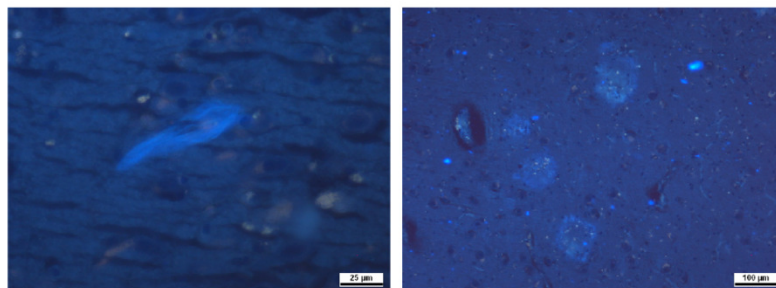


Yield: 35%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.05 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.38-7.22 (m, 6H), 7.22 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.02 (s, 6H), 2.98 (s, 6H) ppm.

HRMS: calcd. for C₃₀H₂₈N₄F₁: 463.2299, found:463.22797

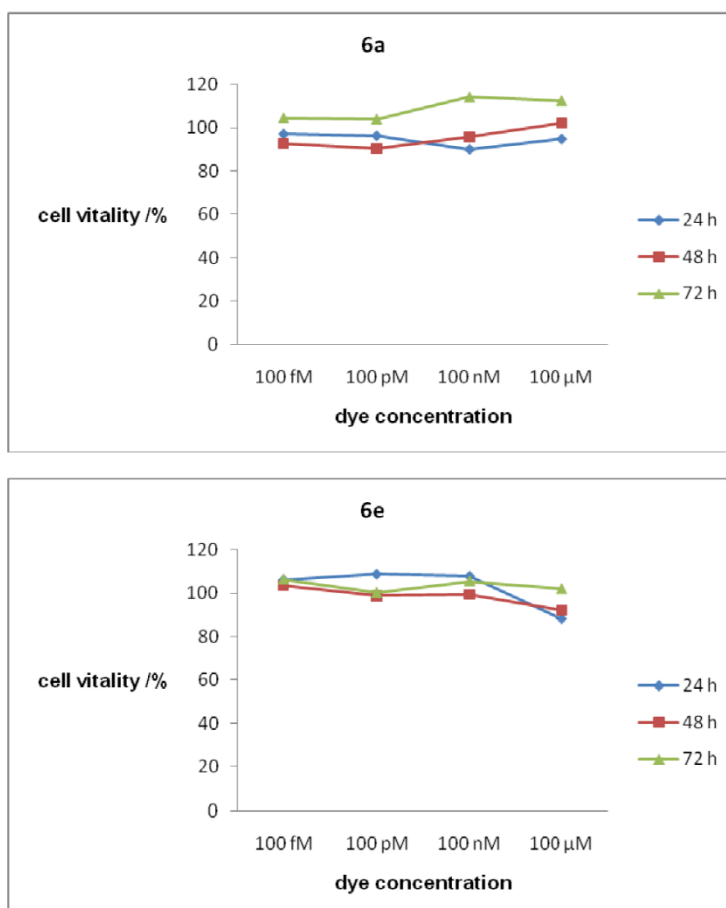
Histochemical staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7e**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

S35

Toxicological evaluation of 6a and 6e



Cell Culture

Liver hepatocellular carcinoma cells HepG2 were maintained in DMEM/F12 1+1 supplemented with 10 % fetal bovine serum. Cells were cultivated under sterile conditions in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂, 95% humidity) without antibiotics. Mycoplasma contamination could be excluded via routine examinations (PCR).

Cell Proliferation Assay

To determine the number of viable cells after dye incubation, the CellTiter 96®AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) was used. Briefly, HepG2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 18.000 cells per cm². 24 hours later, cells were incubated with 100 fM, 100 pM, 100 nM or 100 µM of **6a** or **6e** for 24, 48, 72 hours. Afterwards, cells were washed three times with PBS and CellTiter 96®AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Reagent was added to the samples. The colorimetric assay is based on the reduction of a tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] into a formazan product by intrinsic dehydrogenases of living cells. The amount of formazan product correlates directly to the number of metabolically active cells, and it was calculated after photometric analysis at $\lambda=492$ nm using a microplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany). To quantify cell viability, absorbances of treated samples were normalized to untreated controls (percentage of nontreated controls), which resulted in cell viability. Thereby cell viability values between 70% and 120 % represent neither cytotoxic nor proliferative effects on HepG2 and loss of cell viability over 30% characterizes a substance as cytotoxic, according to DIN ISO 10993-5:2009.

Animal Models

Double transgenic mice harbouring the APP_{swe} and PS1_{ΔE9} mutation (B6.Cg-Tg(APP_{swe},PSEN1_{ΔE9})85Dbo/Mmjax, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were crossed to YFP-H mice (Feng et al. 2000; B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). APP_{swe}PS1_{ΔE9} mice develop severe plaque pathology from 6 month of age. Mice were group housed under pathogen-free conditions until surgery, after which they were singly housed. All procedures were in accordance with an animal protocol approved by the University of Munich and the government of upper Bavaria (Az. 55.2-1-54-2531-188-09).

S37

Cranial Window Surgery

For *in vivo* imaging, a chronic cranial window was prepared as described previously (Fuhrmann et al. 2007; Holtmaat et al. 2009).

The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (0.14/0.01 mg/g body weight; WDT/Bayer Health Care, Garbsen/Leverkusen, Germany). Additionally, dexamethasone (6 µg/g body weight; Sigma) was intraperitoneally administered immediately before surgery. Utilizing the open skull preparation, a cranial window was placed above the somatosensory cortex. For repositioning during repetitive imaging a small metal bar, containing a hole for a screw, was glued next to the window. After surgery, mice received subcutaneous analgesic treatment with carprofen (7.5 µg/g body weight; Pfizer, New York, NY, USA) and antibiotic treatment with cefotaxim (0.25 mg/g body weight; Pharmore, Ibbenbüren, Germany).

Dye Application and Two-Photon *in vivo* Imaging

Two-photon imaging began after a 3 week recovery period post-surgery utilizing a LSM7MP setup (Zeiss) equipped with a MaiTai DeepSee laser (Spectra Physics). Images were obtained using 20x water immersion objectives (1.0 NA, Zeiss) with less than 50 mW laser power to avoid phototoxicity. For plaque staining, 2 mg/kg of the marker (dissolved in 10% DMSO, 45% PBS and 45% 1,2-propanediol) were intraperitoneally injected 4h before the imaging sessions. For examination, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine. Two-photon excitation was performed at 880 nm for **6a** (emission BP 575-640) and YFP (BP 500-550), and Methoxy X04 **4** was excited with 750 nm (BP 435-485 nm).

Computational Methods

All quantum calculations were performed with Turbomole 6.3.1.^{1, 2, 3, 4} Equilibrium structures of the various compounds in their electronic ground state were determined within density functional theory (DFT) with the hybrid b3-lyp density functional,^{5, 6, 7} and the basis set def2-TZVP⁸ (triple zeta quality with polarisation functions).

Multiple grid techniques (m4 grid) were used in the numerical integration steps required for the determination of the exchange-correlation contribution and the resolution of the identity (RI) approximation was employed together with the corresponding RI basis set for the description of the two-electron Coulomb contribution (RI-J). Convergence criterion in the self-consistent field (SCF) calculations was typically an absolute value for the energy change to remain in two subsequent SCF cycles well below $1 \mu E_h$ (microHartree), in some cases below $1 nE_h$. All energy-optimized structures were confirmed to correspond to local minima on the Born-Oppenheimer potential energy hypersurface by computation of the harmonic vibrational wavenumbers via analytical second derivatives of the energy with respect to displacements of the nuclei. Vertical electronic singlet excitation energies and corresponding electronic transition dipole moments at the equilibrium structure of the electronic ground state were obtained in the framework of TDDFT within the random phase approximation for the molecules in the gas phase. The same basis set as before was employed, but the RI approximation was not used in these calculations. Solvent effects were not accounted for. Nevertheless the comparison between computed and measured values of the singlet excitation energies of longest wavelength were considered as a gauge for the quality of the underlying quantum chemical description of the electronic structure. Electric static isotropic electronic polarizabilities α and their anisotropies were computed for the molecule in the gas phase within time-dependent density functional theory (TDDFT) with the same basis set (but without invoking the RI approximation). The computed isotropic values are reported as polarizability volumes $\alpha' = \alpha/(4 \pi \epsilon_0)$ in units of the Bohr radius cubed (a_0^3).

- 1 TURBOMOLE V6.3.1 2011, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.
- 2 R.Ahlrich, M.Baer, M.Haeser, H.Horn, C.Koelmel. *Chem.Phys.Lett.* 162: 165 (1989)
- 3 O.Treutler and R.Ahlrichs *J. Chem. Phys.* 102: 346 (1995)
- 4 M.v.Arnim and R. Ahlrich *J.comp.Chem.* 19: 1746 (1998)
- 5 A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 6 S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 1980, **53**, 1200.
- 7 R.H. Hertwig, W. Koch, *Chem. Phys. Lett.*, 1997, **268**, 345.
- 8 F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**(18), 3297–3305.

Table 2: Cartesian components of the static electronic polarizability tensor reported as $\alpha' = \alpha_{ab}/(4\pi\epsilon_0)a_0^3$ in units of a_0^3 with a,b being elements of {x,y,z}. Only the upper triangular part is reported in the order $\alpha'_{xx}, \alpha'_{xy}, \alpha'_{xz}, \alpha'_{yy}, \alpha'_{yz}, \alpha'_{zz}$

molecule			
5a	262.4982704108177	69.00677045140949 294.2900113617149	-44.33218258692747 -267.8347915425095 963.7249543045604
5b	225.9494456405219	10.71360146212114 732.7211957323925	8.311362416549132 4.051667788438842 127.7983384533197
5c	810.1382440635023	22.80803355918915 147.9021320085703	-177.9406778413931 -0.2528967549393659 304.3277473645971
5d	276.6581875103774	37.00863779449766 210.5302434366262	-85.57858747173205 -5.778976630584233 877.7718625816733
5e	338.3776370336508	-0.001590035860855782 219.1438019134773	-100.5422670750512 0.001749591087893206 1123.108946736544
5f	1028.528016669583	245.2956821874811 -2.376573237499612	-365.8005210498284 -8.008897763840713 549.1169139372016
5g	347.2382189028332	0.09417006545604528 233.2267085026278	-97.04599540445625 2.139024770686586 1173.677357835677
5h	362.9956644342415	-8.234163123899293 214.5679778579173	-202.8755064578807 -52.98259360080004 1126.417682915112
6a	897.5801039781438	-35.40112222056501 172.7698456416408	-0.008146052552323813 0.003314588141119013 316.6300524018481
6b	973.5272870174524	-47.98689444128011 216.5436314865494	0.006775023380949208 0.01460922348211651 361.8480504910972
6c	1050.303314352402	-60.21836551784305 246.1212918350798	0.01433388837446656 -0.01028524609585979 393.2871963731071
6d	1011.685271594847	-57.03573250802267 231.5593640564014	-0.002375777685746594 -0.001060092086346748 375.5621155113077
6e	411.8120836909569	-104.0899960102595 473.3341752064377	-302.0573840625522 247.6305858910980 681.3269214917525
6f	1349.389573696845	25.32643743681051 360.0481804452535	0.9069229789798813 -0.4604411237489425 195.0510634072083
7a	790.3283442057852	-19.93132279599062 234.6074499299077	-318.0399370713891 33.57825112763442 650.5704317761166
7b	869.5673729345548	-30.99928665565317 277.7218664523716	-330.6858560296066 34.31078928820821 693.8829458771067
7c	588.2056507071935	-190.9029386308541 464.2329868044077	60.27793157727974 -60.75739316391270 204.1849945751337
7d	788.2110453087106	-23.42352449166784 247.0292111142860	-303.4775703374345 27.08358803798068 705.3790513476227
7e	793.1406156050651	-21.81806196717561 235.7363313157532	-322.2746514257645 31.36914614917355 652.4555452239658

3.1.3. Synthese und histologische Evaluation von substituierten Harnstoffderivaten und Carboxamiden für die Alzheimer'sche Krankheit

Der Inhalt dieses Kapitels wird im Juni 2012 bei der Fachzeitschrift *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* zur Veröffentlichung eingereicht.

Titel: Synthesis and histological evaluation of substituted urea derivatives and carboxamides in Alzheimer's Disease

Autoren: Alexander Boländer, Rüdiger Wittmann, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech und Boris Schmidt.

Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel vorgestellten Verbindungen leiten sich von der Substanzklasse der Phenylthiazolhydrazide ab. Diese haben sich *in vitro* als effiziente Inhibitoren der Tau-Aggregation erwiesen.^[159] Um diese Strukturklasse auch für die Entwicklung fluoreszenter Marker zu nutzen, wurde das PTH-Grundgerüst mit einem fluoreszenten Cumarin-Rest ausgestattet. Ebenso wurden strukturell Harnstoffderivate synthetisiert, die ebenfalls diesen fluoreszenten Rest tragen. Die Quantifizierung der Affinitäten zu Tau- und A β -Aggregaten *in vitro* ergab, dass eine dieser Verbindungen eine deutlich höhere Affinität zu Tau-Aggregaten gegenüber aggregiertem A β aufweist. Die Synthese weiterer fluoreszenter Harnstoffe führte auch zu Oxadiazol- bzw. Thiadiazol-substituierten Derivaten und Carboxamiden. Letztere konnten aufgrund ihrer spektralen Überlappung mit dem Referenzfarbstoff Thiazinrot® des Verdrängungsassays nicht auf ihre Affinität zu Tau- und A β -Aggregaten untersucht werden. Die Toxizität der synthetisierten Verbindungen wurde am Laich bzw. an Embryonen des Zebrafisches bestimmt. Dabei wurden auch Informationen bezüglich der Zellgängigkeit gewonnen.

Beitrag A. Boländer: Synthese von **5, 6, 9, 10, 12, 14, 15, 23a-e**; histochemische Färbungen mit **10, 14, 15**; toxikologische Evaluation; Datenanalyse Histologie, Affinität und Toxikologie



Synthesis and histological evaluation of substituted urea derivatives and carboxamides in Alzheimer's Disease

Alexander Boländer^a, Rüdiger Wittmann^a, Roland Heyny-von Haußen^b, Gerhard Mall^b, Valérie Goetschy^c, Christian Czech^c, Boris Schmidt^{a,*}

^aClemens Schöpf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

^bCenter of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

^cF. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received

Revised

Accepted

Available online

Keywords:

Chemical Imaging

Alzheimer's Disease

oxadiazolylureas

carboxamides

Curtius rearrangement

ABSTRACT

Alzheimer's disease is characterized by two notorious protein aggregates in the brain: extracellular senile plaques consisting of β -amyloid peptides and tau protein derived intracellular paired helical filaments. The chemical imaging of these deposits represents an important contribution to the distinct diagnosis of the disease and the monitoring of its progression. Established ligands however show insufficient pharmacokinetics, non-ideal single-photon excitation in tissue and very slow clearance. Since the need for new markers is high, we synthesized new kinds of fluorescent markers comprising phenylthiazolyl-hydrazides and urea derivatives. We evaluated their applicability as imaging agents on human brain tissue and in a thiazine red-displacement assay. Their bioavailability and toxicity was investigated using a zebrafish larvae assay.

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

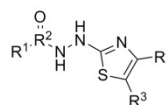
1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related disease of the human brain which is predicted to affect up to 66 million patients within the next twenty years.¹ As a progressive neurodegenerative disorder the symptoms of AD comprise memory loss, spatial disorientation and gradual deterioration of intellectual capacity. AD is still incurable and an unerring diagnosis can be carried out only by postmortem investigation of brain tissue, when two kinds of abnormal protein deposits are detectable.² These pathological hallmarks of AD, which start to accumulate long before symptoms emerge, are extracellular senile plaques composed of β -amyloid peptides and intracellular tau protein derived tangles. According to two competing theories, either A β -plaques or tau tangles are considered the trigger of nerve cell degeneration and proceeding cognitive decay.^{3,4} Due to an overwhelming interest in A β numerous efforts to visualize plaques in the living patient have been reported.^{5,6} The development of A β selective radiotracers enabled for PET-imaging techniques but also confirmed earlier results of post-mortem investigation, that plaque load of the brain and the degree of cognitive deterioration do not correlate in all cases.⁷ The so far neglected tau pathology seems to correlate much better with AD pathogenesis and the development of tau-selective markers for a prospective in vivo imaging of NFTs in addition to

A β plaques may improve the diagnosis of AD at earlier stages.⁴ Therefore new ligands are needed to gain insight whether a drug candidate is engaging the correct target and to provide insight into disease progression. We sought non-toxic dyes of high photostability and high affinity to tau, ease of handling and applicable to biological and histological staining.

2. Results and Discussion

We reported on the identification of phenylthiazolyl-hydrazides (PTHs) as new leads for the inhibition of tau aggregation in AD and the PTH-scaffold to be crucial for activity (Figure 1).^{8,9}

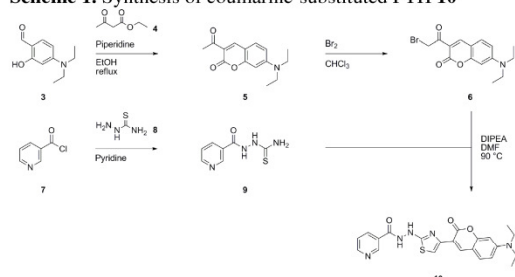


Since these results suggest a fundamental affinity of this substance class to AD associated tau fibrils in vitro and in cells, we aimed to develop fluorescent PTHs as imaging agents for tau deposits by introducing the 7-diethylamino-coumarino moiety to the PTH scaffold. The same rationale was exploited to arrive at the tau ligand TH2.¹⁰ PTHs can be obtained by the reaction of thiosemicarbazides and alpha-bromo ketones (Hantzsch thiazole synthesis).⁸ The required 3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)-

* Corresponding author. Tel.: +49 6151 164531; fax: +49 6151 163278; e-mail: schmidt_boris@t-online.de

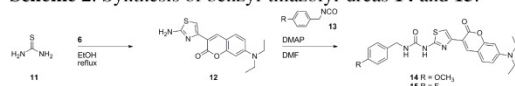
coumarine **6** was obtained via a two step synthesis (Scheme 1). From the condensation of 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde **3** and ethyl 3-oxobutanoate **4** resulted 3-acetyl-7-(diethylamino)-coumarine **5**¹¹, which was brominated to yield the α -bromo ketone **6**.¹² This underwent a PTH-forming Hantzsch thiazole synthesis with 2-nicotinoylhydrazinecarbothioamide **9**, obtained from the reaction of nicotinoyl chloride **7** and thiosemicarbazide **8** respectively,⁸ which finally yielded the coumarine-substituted PTH **10**.

Scheme 1. Synthesis of coumarine-substituted PTH **10**



The α -bromo ketone **6** can also be used to generate aminothiazole **12** by the reaction with thiourea **11**. The subsequent reaction of **12** with aromatic isocyanates delivers the benzyl-thiazolyl-ureas **14** and **15**, which also carry the thiazolylcoumarine moiety with its high fluorescence (Scheme 2).

Scheme 2. Synthesis of benzyl-thiazolyl-ureas **14 and **15**.**

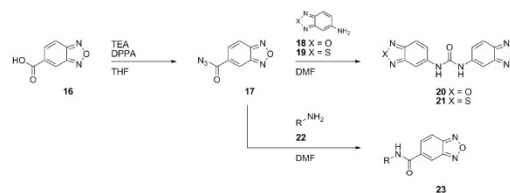


The affinity of these compounds to tau fibrils was pre-evaluated by histochemical staining of human hippocampal AD brain tissue and subsequent analysis by fluorescence microscopy. The staining experiments showed good staining of tau fibrils and A β plaques with high contrast, low background staining and high photostability in accord with immunohistochemical staining. The antibodies *anti-PHF Tau clone AT8 mAb* for tau deposits and

Amyloid A4 for A β plaques were used for immunohistological staining (Figure 2). These results indicate that the scaffold holds potential for the development of tau fibril markers.

In order to synthesize another class of fluorescent derivatives, we employed a two step synthesis for the benzoxadiazolyl ureas **20** and **21** based on the conversion of benzoxadiazole-5-carboxylic acid **16** to benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide **17** and its reaction with benzoxadiazol-5-amine **18** and benzothiadiazol-5-amine **19** to the desired products (Scheme 3).

Scheme 3. Synthesis of acyl azide **4 and its conversion to oxadiazolylureas **7** and **8** and oxadiazol-carboxamides **10**.**



The advantage of this method lies in the *in-situ* generation of the corresponding isocyanate by Curtius rearrangement of acyl azide **17**. The formed urea derivatives **20** and **21** can be isolated easily by crystallization from aqueous solution. Surprisingly this reaction does not work for benzyl amines **22**, since their analogous conversion with acyl azide **17** did not yield the expected urea derivatives, but the corresponding carboxamides **23** which precipitated from aqueous solution in high yields (Scheme 3).

The symmetric dioxadiazol and dithiadiazol ureas **20** and **25** can also be obtained by the direct reaction of the corresponding amines **18** and **19** with triphosgene **24** in a one step reaction (Scheme 4). Even though the yields of this one step reaction are higher, the requirement of triphosgene **24** impacts its convenience.

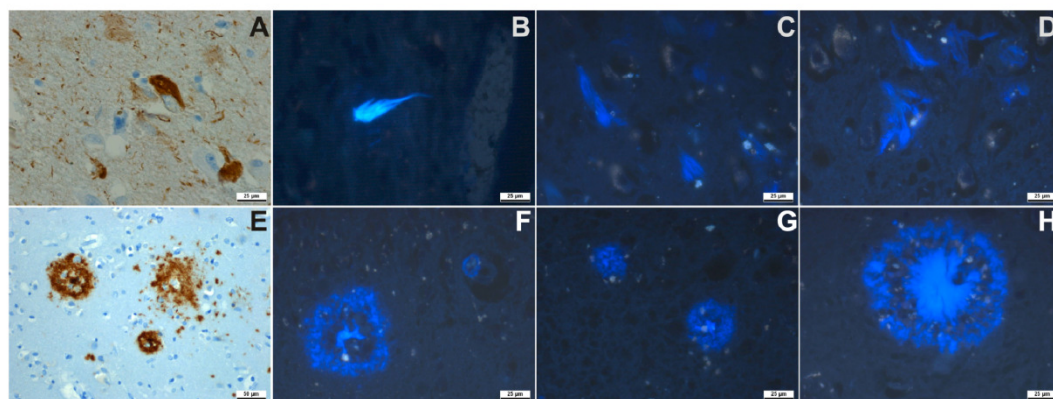
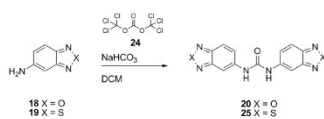


Figure 2. Immunohistological staining of NFTs (A) and amyloid plaques (E) and histochemical staining of both kinds of deposits with **10** (B,F), **14** (C,G) and **15** (D,H), filter set 02 G365, FT395, LP420.

Scheme 4. One-step synthesis of symmetric dioxazolyl and dithiadiazolyl ureas **7** and **12** by conversion of the corresponding amines **5** and **6** with triphosgene **11**.



Due to the oxadiazolyl moiety, these ureas and carboxamides show a significant fluorescence and the application to human AD brain tissue again displayed an excellent performance in the staining of tau fibrils and amyloid plaques at high contrast, low background staining and high photostability.

However, histological *in vitro* staining experiments provide only little information on absolute affinities and are not directly comparable with respect to prospective *in vivo* imaging applications. So we tested all compounds in a thiazine red displacement assay to determine their IC_{50} values for aggregated tau and $\text{A}\beta_{40}$, which provides the required concentration of the tested ligand to replace thiazine red from half of the present binding sites. The results are listed in table 1. The affinities of the oxadiazolyl and thiadiazolyl ureas and carboxamides could not be determined due to spectral overlap with the reference compound thiazine red. The measured IC_{50} values confirm the results of the qualitative *in vitro* staining experiments. How much more affine a marker has to be towards a favored target in comparison to a competing one has to be elucidated *in vivo*. Urea **15** however has a 9.3-fold higher selectivity for aggregated tau compared to aggregated $\text{A}\beta$ and may therefore hold potential for a selective *in vivo* imaging of NFTs in AD.

In order to evaluate the toxicity and cell permeability of the compounds, we performed a zebrafish larvae assay, in which zebrafish eggs were treated with solutions of the compound (1 μM and 10 μM) over 72 hours *post fertilization* (pf). The survival rates of the treated larvae did not vary from those of untreated controls in all cases. With increasing dye concentration an

increase of fluorescence of the larvae due to a higher dye uptake could be detected by fluorescence microscopy (Figure 3).

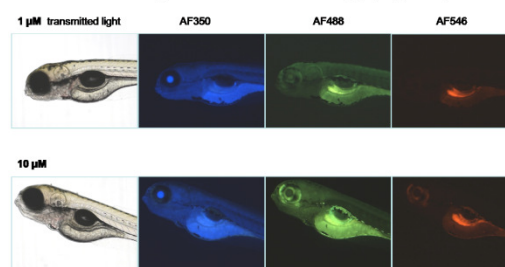


Figure 3. Zebrafish larvae 72 h pf. treated with a 1 μM and 10 μM solution of **15** at transmitted light and fluorescence filters AF350, AF488 and AF546.

3. Conclusion

In summary, we successfully developed a series of fluorescent probes including PTH, urea derivatives and carboxamides and evaluated their applicability as histochemical imaging agents in AD. All compounds labeled both AD associated deposits (tau fibrils and $\text{A}\beta$ plaques) in the *in vitro* screen on human brain AD tissue, which employed fluorescence microscopy. The affinity-determination demonstrated one compound to be 9.3-fold higher selective for aggregated tau compared to aggregated $\text{A}\beta$ *in vitro*, which holds potential for a selective *in vivo* imaging of NFTs in AD. In a zebrafish larvae based assay we demonstrated the nontoxicity and cell permeability of the compounds. The detailed clearance and the affinity in mammals is subject to ongoing studies.

compound		IC_{50}		clogP	tPSA	MW
		aggr. Tau	aggr. $\text{A}\beta$			
10		207	282	2.89	95.39	435.50
14		279	622	3.35	92.26	480.53
15		10	93	3.57	83.03	468.54
20		nm		3.03	109.03	296.24
21				3.53	99.8	312.31
25				3.78	90.57	328.37
23						
a				3.26	63.05	253.26

b		3.18	72.28	283.28
c		3.18	72.28	283.28
d		3.41	63.05	271.25
e		3.41	63.05	271.25
f		3.48	63.05	289.24
g		4.15	63.05	321.25
h		3.23	81.51	297.27

References

1. : World Alzheimer Report, 2011.
2. Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, *48*, 3030.
3. Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science (Washington, DC, United States)* **2002**, *297*, 353.
4. Ballatore, C.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 663.
5. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G.-f.; Estrada, S.; Ausen, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. *Annals of Neurology* **2004**, *55*, 306.
6. Ewers, M.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E.; Weiner, M. W.; Hampel, H. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 430.
7. Gravitz, L. *Nature (London, United Kingdom)* **2011**, *475*, S9.
8. Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E.-M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E. *Biochemistry* **2007**, *46*, 10016.
9. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E.-M.; Waldmann, H.; Mandelkow, E. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 1740.
10. Ono, M.; Hayashi, S.; Matsumura, K.; Kimura, H.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Mori, H.; Saji, H. *ACS Chemical Neuroscience* **2011**, *2*, 269.
11. Czerney, P.; Hartmann, H. *J. Prakt. Chem.* **1982**, *324*, 21.
12. Fuglseth, E.; Anthonsen, T.; Hoff, B. H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1290.

Supporting Information for

Synthesis and histological evaluation of substituted urea derivatives and carboxamides in Alzheimer's Disease

Alexander Boländer^a, Rüdiger Wittmann^a, Roland Heyny-von Haußen^b, Gerhard Mall^b,
Valérie Goetschy^c, Christian Czech^c, Boris Schmidt^{a,*}

^a*Clemens Schöpf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany*

^b*Center of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany*

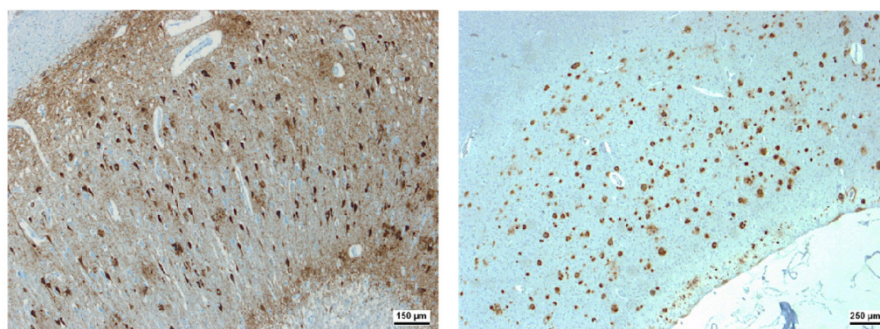
^c*F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland*

Tissue Probe Preparation

Human hippocampal tissue fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin was cut to 4 μm sections in a microtome and mounted on standard microscope slides. Subsequent deparaffinization was carried out in xylol (15 min), ethanol 100 % (10 min), ethanol 96% (10 min) and ethanol 70% (10 min). Until subsequent processing the slides were stored in water.

Immunohistochemical Staining

Immunohistochemical staining was performed on 4 μm sections by using a Ventana Benchmark automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ) applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), TAU Ab-3 (Neomarkers, Fremont, CA) and Amyloid A4 (BAM10, Sigma, St. Louis, MO) and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ).



Immunohistochemical staining of tau fibrils (left, antibody AT8 mAb) and A β -plaques (right, antibody Amyloid A4).

Histochemical Staining with Fluorescent Dyes

The staining procedure comprises the following steps of brain section treatment: nucleus staining with acidic haemalm (10 min), blue annealing by water wash-up (5 min), application of the dye solution (2.5 mM) (10 min), ethanol wash-up, water-bath (5 min), 1% acetic acid-bath (15 min), water wash-up and covering with standard glass covers.

Light Microscopy and Fluorescence Microscopy

4 μm sections stained with fluorescence probes were analysed by indirect fluorescence microscopy using an Axioskop microscope with a HBO100 fluorescence illuminator (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the bandpass filter set 09 BP450-490, FT510, LP515, the filter set 02 G365, FT395, LP420 and the filter set 15 BP546, FT580, LP590 (all Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Digital image processing was done with a Leica DFC 300FX fluorescence camera (Leica Microsystems, Heerbrugg, CH) and the software ImageAcces Premium Version 5 (Imagic AG, Galtbrugg, CH).

Thiazine Red R Displacement Assay

Recombinant human microtubule associated tau protein purified from *E.coli* was aggregated at a concentration of 5 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM pH8, 24h at 37°C. Synthetic A β ₄₀ was aggregated at a concentration of 50 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM pH8, for three days at 37°C, under shaking at 150 rpm.

Thiazine Red R was added at the concentration corresponding to the K_d of the respective aggregated protein binding site to induce a fluorescent signal that can be inhibited by the addition of a displacer compound. (K_d for aggregated tau = 18 nM, K_d for aggregated A β = 49 nM).

To determine the affinity of a displacer compound to the *Thiazine Red R* binding sites of the aggregated proteins, the compound was added at different concentrations to the assay ranging from 0.1 nM to 10000 nM. For the inhibition curve, the compound was measured together with the aggregated proteins and *Thiazine Red R*. The fluorescence of some dyes overlapped with the fluorescence of *Thiazine Red R* when measured at 595 nm. Therefore, compounds were also measured together with the aggregated proteins, but without *Thiazine Red R* (autofluorescence curve) (Figure 1). Net-fluorescence was calculated by subtracting the fluorescence of the wells without *Thiazine Red R* from the fluorescence of wells containing *Thiazine Red R* (inhibition curve) (Figure 2). As negative control *Thiazine Red R* and aggregated protein was used. As positive control, *Thiazine Red R*, reference compound with known activity (see Table 1) and aggregated protein was used.

The assay was performed in Perkin Elmer OptiPlate 384, black, 45 mL assay volume. As assay buffer DPBS (no CaCl₂ no MgCl₂) (GIBCO N. 14020) was used. The tested compounds were diluted in DMSO and 2 μ L of the solution was added to the assay (5% DMSO final). The assay was started by the addition of the aggregated protein (competitive condition). The plates were shortly shaken (1 min with Sterico variomag teleshake) and incubated at room temperature for 30 min. Measurements were performed with En:Vision (Perkin Elmer), at Excitation 531 nm / Emission 595 nm.

Corresponding IC₅₀ values (inhibitory concentration for 50% decrease) were calculated using the Levenburg Marquardt algorithm:

$$y = A + ((B-A)/(1+((C/x)^D)))$$

Item	Description
A	The bottom plateau of the curve corresponds to the final minimum y value.
B	The top of the plateau of the curve corresponds to the final maximum y value.
C	The IC ₅₀ value represents the x value at which the half maximum y value is attained.

D	The slope factor. In this model a positive value is returned when y increases with increasing x and a negative value when y increases as x is decreasing.
x	Concentration of the tested compound (nM)
y	Net fluorescence in % of controls.

The obtained values are the average values of replicate experiments. The statistical presentation follows the guidelines laid out by G. Cumming, *J. Cell Biology*, **2007**, 177, 7-11.

Table 1: Determination of IC₅₀ values for different compounds on aggregated proteins using the *Thiazine Red R* assay. Data represent average of technical replicates.

	aggr. tau - IC ₅₀ (nM)	aggr. Aβ ₄₀ - IC ₅₀ (nM)
Evans Blue	1.0	89
Congo Red	5.4	14
Hondson 1d*	8.8	13
BSB	18	78
MeXO4	246	140
Crystal Violet	1545	1280
FDDNP	1635	1467
IMPY	2707	5671
PIB	3255	5190
AZD2184	9802	>10000
FENE	>10000	>10000
BF-158	>10000	>10000

* Compound Honson 1d from Honson et al, *Neurobiol Dis.* **2007**, 28(3), 251-60.

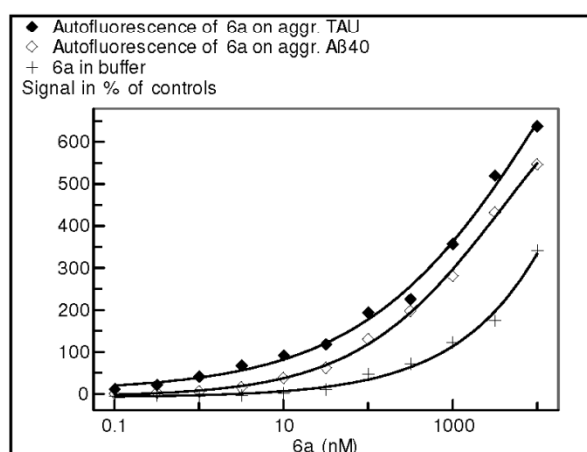


Figure 1: Fluorescence of **6a** in buffer or in presence of aggregated tau or aggregated A β_{40} .

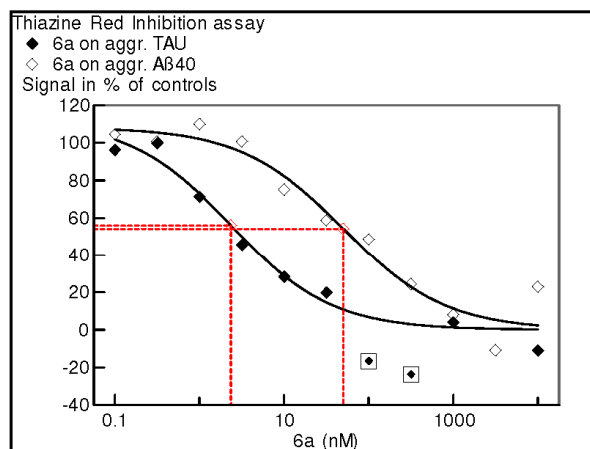


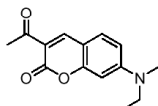
Figure 2: Inhibition curve in *Thiazine Red R* assay of the compound **6a**, with IC₅₀ determination for aggregated tau and aggregated A β_{40} .

Experimental Conditions

All chemicals were purchased as reagent grade from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise noted. Proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker DRX 500 at 500 MHz and 125.75 MHz respectively at 293 K. The chemical shifts are given in parts per million (ppm) on the delta scale (δ) and are referenced to tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm), ^1H NMR. Abbreviations for NMR data: s = singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; qi = quintet; dd = doublet of doublets; dt = doublet of triplets; dq = doublet of quartets; tt = triplet of triplets; m = multiplet. Mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 magnetic sector spectrometer. Thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck TLC silica gel 60 F 254 (0.2 mm) on Aluminium sheets. Silica gel columns for chromatography were prepared with E. Merck silica gel 60 (0.063-0.20 mesh ASTM). UV/vis-spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrometer, fluorescence spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu RF-1501 Spectrofluorophotometer. 2D fluorescence spectra were recorded on a Tecan Infifite® M1000.

3-acetyl-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one 5

To a solution of 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde (1g, 5.15 mmol) in 10 mL ethanol, ethyl 3-oxobutanoate (0.67 g, 5.15 mmol) and piperidine (10 μ L) were added. The mixture was stirred at 78 °C for 2 hours. After cooling to ambient temperature, the resulting crystals were filtered off and recrystallized from ethanol to yield 3-acetyl-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **5** (1.2 g, 4.58 mmol, yield: 89%).



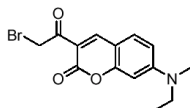
EI-MS: m/z = 259

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.24 (t, , J = 7.2 Hz, 6H), 2.68 (s, 3H), 3.46 (q, , J = 7.2 Hz, 4H), 6.47 (s, 1H), 6.62 (m, 1H), 7.39 (d, , J = 9.0 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 12.4, 30.6, 45.2, 96.7, 108.2, 109.9, 116.2, 131.9, 147.8, 153.0, 158.8, 160.9, 195.7 ppm.

3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one 6

3-acetyl-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **5** (250 mg, 0.96 mmol) was dissolved in 2 mL CHCl₃ and a solution of bromine (0.153 g, 0.96 mmol) in 5 mL CHCl₃ was added over 5 hours. The resulting solution was extracted with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and after evaporation of the solvent, the crude product was purified by column chromatography to obtain 3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **6** (232 mg, 0.69 mmol, yield: 72%).

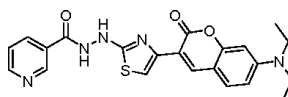


EI-MS: m/z = 338

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.27 (t, , J = 7.2 Hz, 6H), 3.46 (q, , J = 7.2 Hz, 4H), 4.77 (s, 2H), 6.48 (s, 1H), 6.66 (m, 1H), 7.42 (d, , J = 9.0 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H) ppm.

N'-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinohydrazide **10**

3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **6** (55 mg, 0.16 mmol), 2-nicotinoylhydrazine-carbothioamide (32 mg, 0.16 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (21 mg, 0.16 mmol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at 90 °C for 2 hours. After cooling to ambient temperature diethyl ether was added and the crystallizing product was filtered off, washed with ethanol and dissolved in ethyl acetate. The solution was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. After separation of the organic layer and evaporation of the solvent *N'*-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinohydrazide **10** was obtained as a yellow solid (31 mg, 0.07 mmol, yield: 44%).



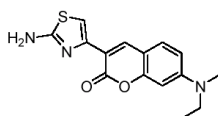
EI-MS: *m/z* = 435

¹H-NMR (DMSO, 500 MHz): δ = 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 3.50 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 6.61 (s, 1H), 6.77 (m, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.63 (m, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.84 (m, 1H), 9.12 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 11.13 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 12.7, 45.0, 96.5, 106.8, 108.3, 109.8, 113.7, 124.2, 128.5, 130.2, 135.6, 139.8, 145.4, 148.7, 150.9, 153.1, 155.6, 159.9, 165.5, 171.8 ppm.

3-(2-aminothiazol-4-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **12**

3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **6** (60 mg, 0.18 mmol) and thiourea (15 mg, 0.2 mmol) were dissolved in ethanol (1 mL) and stirred at 78 °C for 2 hours. After cooling to ambient temperature CH₂Cl₂ (5 mL) were added and the solution was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layer was dried with NaSO₄ and after evaporation of the solvent, 3-(2-aminothiazol-4-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **12** (49 mg, 0.16 mmol, yield: 88%) was obtained.



EI-MS: *m/z* = 315

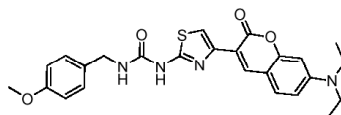
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H) (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.21 (s, 2H), 3.43 6.51 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.60 (m, 1H), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.38 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 12.5, 29.7, 44.9, 53.4, 97.0, 107.5, 108.8, 109.2, 113.8, 129.4, 139.8, 150.7, 155.7, 160.7, 166.4 ppm.

Synthesis of benzyl-thiazolyl ureas

3-(2-aminothiazol-4-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **12** (66 mg, 0.2 mmol) 4-dimethylaminopyridine (1.2 mg 0.01 mmol) were dissolved in DMF (3 mL) and heated to 65 °C. After addition of the corresponding isocyanate the reaction mixture was stirred at 65 °C for 12 hours. After cooling to ambient temperature, 5 mL of water were added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried and after evaporation of the solvent, the crude product was purified by column chromatography to yield the desired product.

*1-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea **14***

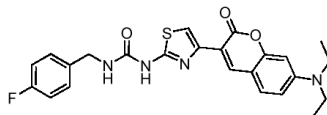


EI-MS: m/z = 478

¹H-NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 3.48 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 6.75 (m, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.29 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 9.8 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz): δ = 13.1, 45.6, 47.8, 60.4, 99.2, 110.2, 11.6, 112.2, 112.4, 128.4, 115.4, 129.2, 133.8, 139.5, 149.3, 153.2, 153.4, 159.6, 163.9, 174.5 ppm.

*1-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea **15***



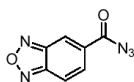
EI-MS: m/z = 466

¹H-NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.40 (s, 2H), 3.47 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 7.2 (m, 4H), 7.30 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 10.68 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz): δ = 12.9, 43.8, 45.2, 97.3, 109.2, 110.4, 113.9, 116.2, 129.7, 137.4, 147.2, 132.8, 137.2, 152.7, 157.8, 162.7, 164.3, 172.6 ppm.

Benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide 17

To a solution of benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carboxylic acid **16** (630 mg, 3.84 mmol) in 3 mL THF, triethyl amine (1.27 g, 4.61 mmol) and diphenylphosphoryl azide (467 mg, 4.61 mmol) were added. The solution was stirred at ambient temperature for four hours. The solvent was evaporated and the crude product was dissolved in dichloromethane. The resulting solution was washed with water and the united organic layers were dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvent and column chromatography benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide **17** (657 mg, 3.47 mmol, yield: 90%) was obtained as a white solid.



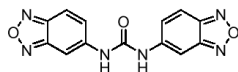
EI-MS: m/z = 147

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.00 (d, ³J = 9.42 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 9.42 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD): δ = 118.61, 122.13, 131.41, 135.89, 150.75, 151.55, 172.54 ppm.

1,3-Bis-(2,1,3-benzoxadiazol-5-yl)urea 20

Benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide **17** (100 mg, 0.53 mmol) was dissolved in 3 mL anhydrous DMF and benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine **18** (96 mg, 0.635 mmol) was added. The solution was heated to 55 °C and stirred for 24 h. Subsequently water (1.5 mL) was added and the mixture was cooled to ambient temperature whereat the product crystallizes. The product was filtered off and washed with water, yielding 1-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)urea **20** (118 mg, 0.4 mmol, yield: 75 %).

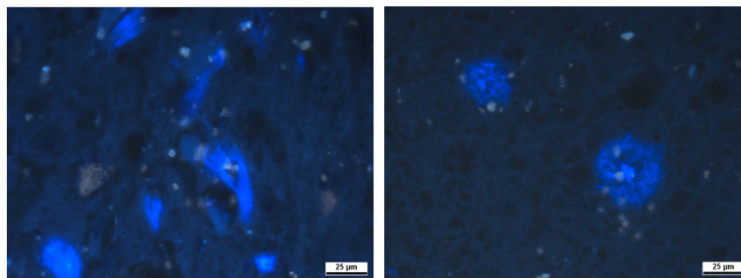


EI-MS: m/z = 161

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 7.47 (m, 2H), 8.02 (d, *J* = 9.45 Hz, 2H), 8.17 (s, 2H), 9.78 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 96.8, 117.4, 130.0, 141.7, 147.1, 149.9, 152.7 ppm.

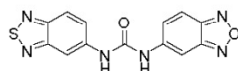
Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **20**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

1-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)urea **21**

Benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide **17** (100 mg, 0.53 mmol) were dissolved in 3 mL anhydrous DMF and benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-amine **19** (96 mg, 0.635 mmol) was added. The solution was heated to 55 °C and stirred for 24 h. Subsequently water (1.5 mL) was added and the mixture was cooled to ambient temperature whereat the product crystallizes. The product was filtered off and washed with water, yielding 1-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)urea **21** (120 mg, 0.38 mmol, yield: 72 %).

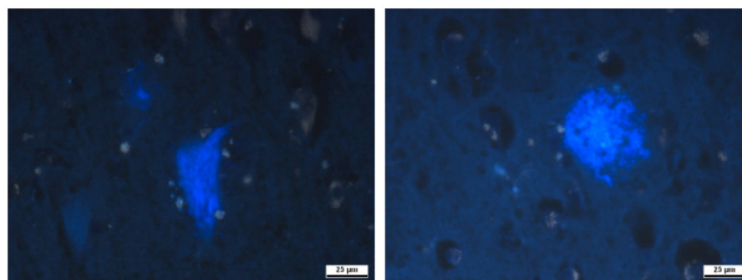


EI-MS: *m/z* = 151

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 7.44 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 8.15 (m, 1H), 8.33 (m, 1H), 9.44 (s, 1H), 9.53 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 96.4, 105.7, 117.3, 121.7, 125.8, 130.0, 140.8, 141.8, 147.0, 150.0, 151.4, 152.6, 155.5 ppm.

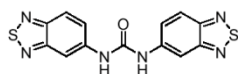
Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **21**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

1,3-Di(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)urea **25**

Benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-amine **19** (100 mg, 0.66 mmol) was dissolved in 4 mL ethyl acetate and 4 mL saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate at 0 °C. Triphosgene (99 mg, 0.33 mmol) was added at 0 °C and the solution was stirred for 1.5 hours. To the reaction mixture ethyl acetate (10 mL) was added, the organic layer was separated and extracted with water. After evaporation of the solvent, the crude product was dissolved in DMF (1 mL), water (0.5 mL) was added and the mixture was cooled. The resulting crystals were filtered off and washed with water, yielding 1,3-di(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)urea **25** (80 mg, 0.25 mmol, yield: 76%) as light brown solid.

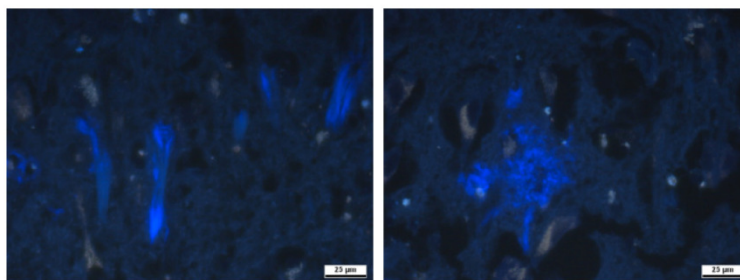


EI-MS: m/z = 151

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 7.68 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 8.37 (s, 2H), 9.64 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 105.1, 121.2, 125.5, 140.7, 150.9, 152.4, 155.2 ppm.

Histochemical Staining:

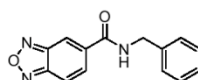


Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **25**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

General procedure for the synthesis of carboxamides 23

Benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carbonyl azide **17** (80 mg, 0.423 mmol) was dissolved in DMF (2mL) and the corresponding amine (0.423 mmol) were added and the mixture was stirred at 60 °C for 24 hours. Addition of water causes crystallization of the desired product, which was filtered off and washed with water.

N-benzylbenzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23a**

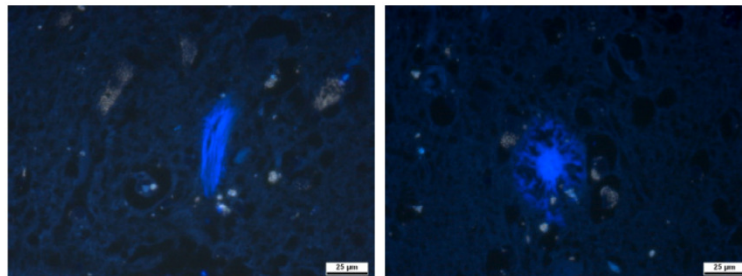


EI-MS: m/z = 253

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 4.53 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.29 (m, 1H), 7.39 (m, 4H), 7.99 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.56 (m, 1H), 9.42 (t, J = 5.9 Hz, 1H) ppm.

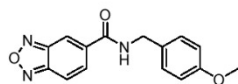
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 42.9, 115.6, 116.3, 126.8, 127.3, 128.3, 131.3, 137.8, 138.9, 148.7, 148.9, 164.4 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23a**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(4-methoxybenzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23b**

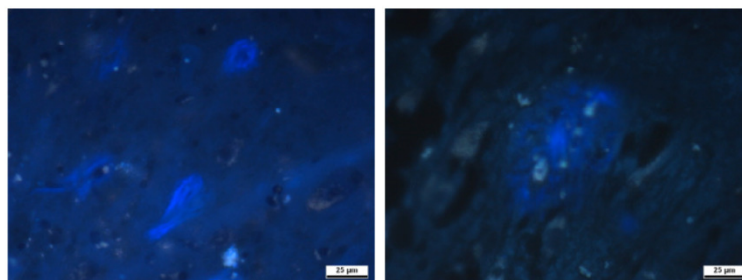


EI-MS: m/z = 283

¹H-NMR (500 MHz, acetone): δ = 3.77 (s, 3H), 4.57 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.03 (m, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.50 (s, 1H) ppm.

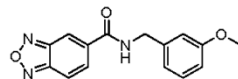
¹³C-NMR (125 MHz, acetone): δ = 42.9, 54.5, 113.6, 115.3, 116.2, 129.0, 130.8, 131.1, 138.4, 149.0, 149.3, 158.9, 164.6 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23b**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(3-methoxybenzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23c**

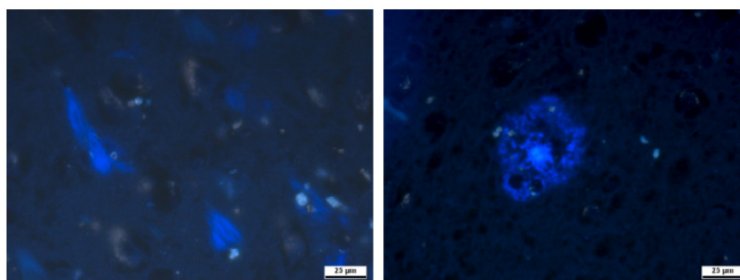


EI-MS: m/z = 283

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 3.74 (s, 3H), 4.50 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 6.81 (m, 4H), 7.98 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 9.40 (t, J = 5.8 Hz, 1H) ppm.

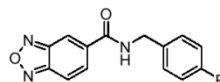
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 42.8, 54.9, 112.2, 113.0, 115.6, 116.3, 119.4, 129.3, 131.3, 137.7, 140.4, 148.7, 149.0, 159.2, 164.4 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **23c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(4-fluorobenzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23d**

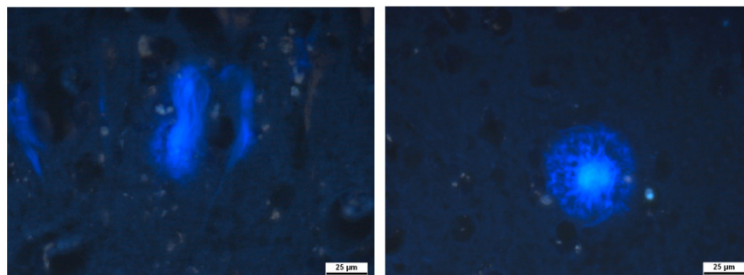


EI-MS: m/z = 271

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 4.52 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 8.00 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 9.41 (t, J = 5.8 Hz, 1H) ppm.

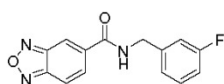
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 42.5, 115.1, 115.4, 116.0, 116.6, 129.7, 131.6, 135.5, 138.1, 149.1, 149.4, 161.6, 162.6, 164.8 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23h**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(3-fluorobenzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23e**

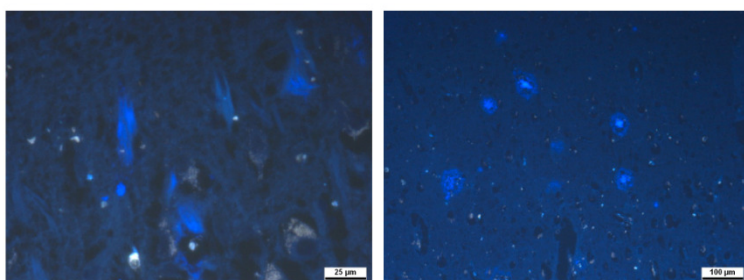


EI-MS: m/z = 271

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 4.54 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.11 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.98 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 9.45 (t, J = 5.9 Hz, 1H) ppm.

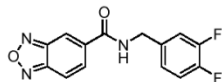
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 42.3, 113.6, 113.9, 115.7, 116.3, 123.2, 130.2, 131.3, 137.6, 141.8, 148.7, 149.0, 162.1, 164.5 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23e**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(3,4-difluorobenzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23f**

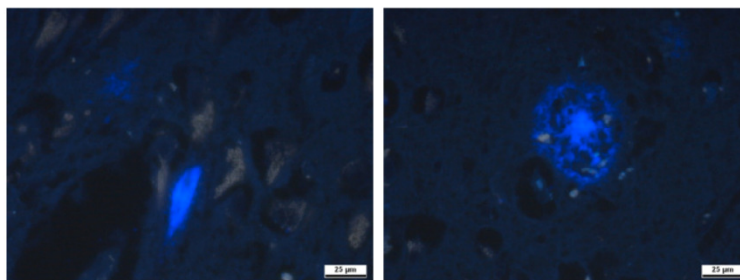


EI-MS: m/z = 289

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 4.49 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.94 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 9.44 (t, J = 5.9 Hz, 1H) ppm.

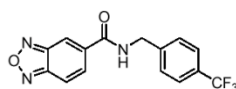
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ = 42.1, 115.9, 116.5, 117.3, 124.1, 131.4, 136.8, 137.7, 148.0, 148.8, 149.1, 162.5, 164.9 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **23f**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(4-(trifluoromethyl)benzyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23g**

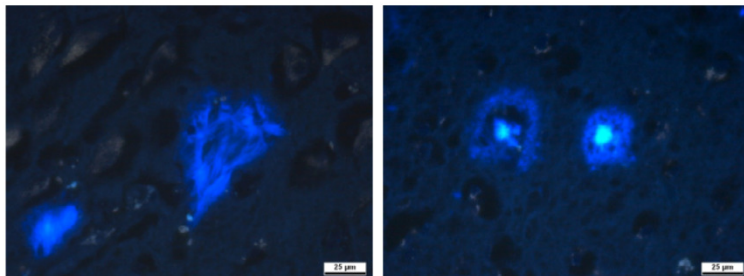


EI-MS: m/z = 321

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ = 4.62 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.61(m, 4H), 7.98 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 9.50 (t, J = 5.9 Hz, 1H) ppm.

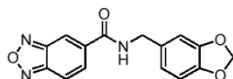
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO) δ = 42.4, 115.7, 116.3, 123.6, 123.8, 129.3, 131.2, 131.4, 137.5, 140.3, 148.7, 149.0, 164.6 ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23g**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole-5-carboxamide **23h**

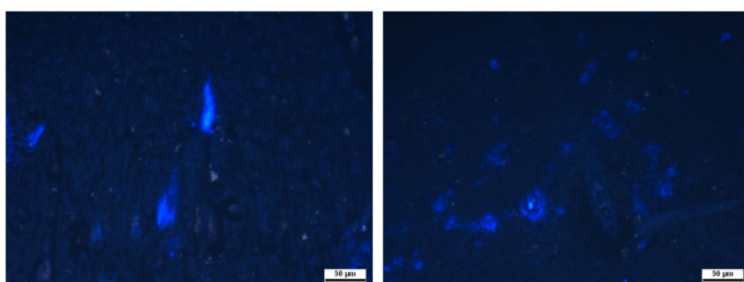


EI-MS: $m/z = 297$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): $\delta = 4.33$ (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 5.85 (s, 2H), 6.75 (m, 2H), 6.81 (m, 1H), 7.79 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 9.32 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): $\delta = 43.6, 101.6, 108.8, 108.9, 116.4, 117.2, 121.6, 131.7, 133.2, 138.5, 146.9, 147.9, 149.4, 149.7, 166.1$ ppm.

Histochemical Staining:



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **23h**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

3.1.4. Synthese von Derivaten des Fluoreszenzmarkers Methoxy-XO4 und ihre Evaluation in Modellen der Alzheimer-Demenz

Der Inhalt dieses Kapitels wird im Juni 2012 bei der Fachzeitschrift *Neurodegenerative Diseases* zur Veröffentlichung eingereicht.

Titel: Synthesis of Methoxy-XO4 Derivatives and their Evaluation in Alzheimer's Disease Models

Autoren: Alexander Boländer, Daniel Kieser, Christoph Scholz, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech und Boris Schmidt.

Zusammenfassung

Durch den Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-XO4 konnten zahlreiche wichtige Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit gewonnen werden. Dabei wurde Methoxy-XO4 sowohl als histochemischer Farbstoff als auch bei *in vivo* Experimenten eingesetzt. An transgenen Mäusen mit kranialem Fenster konnten durch den Einsatz dieses Farbstoffes und mittels Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie aufschlussreiche Langzeitstudien bezüglich des Wachstums einzelner Plaques durchgeführt werden. Ebenso wurde Methoxy-XO4 als ^{13}C -markierte PET-Probe bei *in vivo* Experimenten im Mausmodell verwendet.^{[113],[111]} Trotzdem gilt dieser Marker aufgrund seiner mangelnden Fähigkeit zwischen Tau- und A β -Aggregaten zu differenzieren und aufgrund seiner schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften als unzureichend. In diesem Kapitel wird eine schutzgruppenfreie Syntheseroute für Methoxy-XO4 vorgestellt, nach der auch weitere Derivate dieses Farbstoffs hergestellt wurden. Die Affinität dieser Derivate zu Tau-Fibrillen und A β -Plaques wurde sowohl qualitativ durch histochemische Färbungen als auch durch Affinitätsmessungen *in vitro* bestimmt. Dabei zeigten einige dieser Derivate deutlich verbesserte Eigenschaften im Vergleich zur Referenzsubstanz Methoxy XO4.

Beitrag A. Boländer: Synthese von **2, 3, 4, 5, 6, 7g, 7j, 7l**; histochemische Färbungen mit **7g, 7j, 7l**; Datenanalyse Histologie und Affinität

Synthesis of Methoxy-XO4 Derivatives and their Evaluation in Alzheimer's Disease Models

Alexander Boländer^{a*}, Daniel Kieser^{a*}, Christoph Scholz^a, Roland Henyny-von Haußen^b, Gerhard Mall^b, Valérie Goetschy^c, Christian Czech^c and Boris Schmidt^{a*}

^aClemens Schöpf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

^bCenter of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

^cF. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received

Revised

Accepted

Available online

Keywords:

Alzheimer's disease

Chemical imaging

Fluorescent markers

Methoxy-XO4

Histology

ABSTRACT

Alzheimer's disease is characterized by two notorious protein aggregates in the brain: extracellular senile plaques mainly consisting of amyloid- β peptides and tau protein derived intracellular paired helical filaments. The diagnosis of Alzheimer's Disease is impaired by insufficient sensitivity and specificity of diagnostic methods to visualize these pathological hallmarks. The established fluorescence marker Methoxy-XO4 stains plaques, tau tangles and amyloid-derived angiopathies with good specificity, yet doesn't enable for a discrimination between them. Since the need for new markers is high, we synthesized derivatives of Methoxy-XO4 and evaluated their applicability as imaging agents in Alzheimer's disease models.

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common form of dementia. With symptoms as memory loss, disorientation, language and cognitive impairment, it is still an incurable and lethal disease accounting for the majority of cases of dementia diagnosed over age 60.¹ The histopathology of AD is characterized by two notorious protein aggregates in the brain: extracellular senile plaques consisting of β -amyloid (A β) peptides and intracellular tau protein derived neurofibrillary tangles (NFTs).²

The overexpression and aggregation of A β in the brain represents one major cause of AD, which can be traced back to the misprocessing of the much larger β -amyloid precursor protein APP, prompted by two different enzymes, β - and γ -secretase. They release short amyloid- β peptides from its precursor, which form ordered oligomeric and fibrillar secondary structures rich in cross- β -sheets, clumping together and forming larger plaques. The proposal that A β accumulation is the primary event in the development of AD pathogenesis is the main statement of the amyloid hypothesis published approximately thirty years ago.³ Imaging studies have shown that plaques can start to accumulate 10 – 15 years before symptoms emerge and there are reports for amyloid plaque load at autopsy, yet no signs of cognitive impairment during lifetime.⁴ These findings limit the diagnostic power of plaque directed probes.

NFTs consist of paired helical filaments of abnormally hyperphosphorylated tau protein.⁵ In healthy neurons, six highly soluble tau isoforms modulate the stabilization of axonal microtubules by their interaction with tubulin. The stabilizing ability of tau protein is lost after its hyperphosphorylation by several serine/threonine and tyrosine protein kinases. Hyperphosphorylated tau has a high tendency to pair with other threads of tau forming intracellular tangles, which lead to fatal neurodegeneration. In contrast to A β plaques, the correlation between tau fibrils and the timing of symptom onset and progression of AD seems to be far more accurate.⁴ The visualization of both kinds of aggregates in the living patient is the basis of a reliable in vivo diagnosis of AD, which is still not possible at present. Currently there is no simple, inexpensive and definite method available to selectively detect A β plaques and NFTs in the brain of a living patient, which makes it difficult to diagnose AD distinctively and to differentiate it from other forms of dementia.

Tau targeting probes have emerged more slowly than amyloid- β directed probes partly due to an overwhelming interest in amyloid- β , partly because of tau's essential role in maintaining cell viability and the lack of essential models of tau aggregation truly reflecting the pathology in humans. By contrast, several efforts have been made to develop A β -labeling markers for imaging techniques like single photon emission tomography (SPECT), positron emission tomography (PET) or other applications like fluorescence spectroscopy or microscopy.⁶

One of the most prominent fluorescent markers is methoxy-XO4, a Congo red and Chrysamine-G derived bisphenolic distyrylbenzene-derivative (Figure 1).⁷

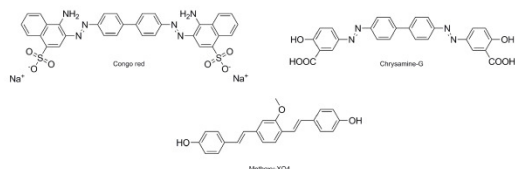


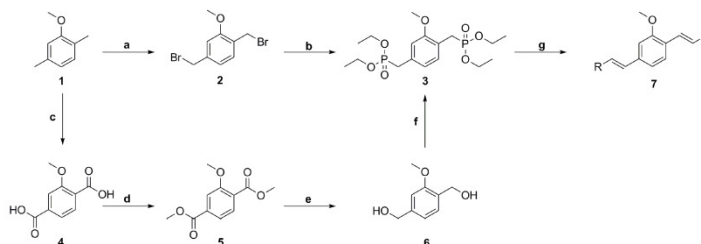
Figure 1. Fluorescent markers for the pathological hallmarks in AD: Congo red, Chrysamine G and Methoxy-XO4.

2. Results and Discussion

Methoxy-XO4 is reported to stain amyloid plaques, NFTs and cerebrovascular amyloid in postmortem histochemical staining experiments with human brain tissue and individual plaques of PS1/APP mice *in vivo* by multiphoton microscopy after intravenous injection. However this ligand seems inadequate to differentiate clearly between A β and tau deposits, which is crucial to clearly evaluate the presymptomatic diagnostic potential of each kind of protein deposit and how each of them correlates with disease progression and neurodegeneration. It also has a very slow clearance in mice and persists for weeks after systemic administration due to its lipophilicity.⁸ Therefore new improved markers are needed which allow for a selective labeling of tau fibrils and amyloid plaques and possess better log P / log D parameters.

Since both A β plaques and tau fibrils exhibit a secondary structure rich in β -pleated regions, major changes to a generally binding scaffold do not seem reasonable.² Therefore we developed a new synthesis for Methoxy-XO4 which allows for derivatization on the flanks of the molecule by introducing different residues of variable size and electron-donating or withdrawing properties (Scheme 1).

Starting with the bromination of 2-methoxy-1,4-dimethylbenzene **1** and subsequent phosphorylation, the Wadsworth-Emmons phosphonate **3** was obtained. Due to the radical mechanism of the bromination reaction of **1**, overbromination inevitably occurs. Therefore we decided to take a different approach: Again starting from 2-methoxy-1,4-dimethylbenzene **1** we prepared the diacid **4** followed by esterification and subsequent reduction to the dialcohol **6**. The dialcohol **6** was halogenated *in situ* and directly phosphonated afterwards to obtain the Wadsworth-Emmons product **3**. The overall yield of 80% of this “one additional step” synthesis is slightly better compared to the 70% we obtained by the shorter **Scheme 1**. Synthesis of Methoxy-XO4 and its derivatives **7**.



route. Methoxy-XO4 **7a** was prepared by a Wadsworth-Emmons reaction of phosphonate **3** and 4-hydroxybenzaldehyde favoring the formation of the *trans*-stilbene product. This step was achieved without MOM-protection of the phenol group of 4-hydroxybenzaldehyde. By the use of various aromatic aldehydes, we synthesized a series of Methoxy-XO4 derivatives, which are shown in table 1.

In order to pre-evaluate the staining potential of these dyes, we applied them to human brain tissue affected by AD pathology. The subsequent analysis by fluorescence microscopy demonstrated a good to excellent staining of either tau, A β or both kinds of deposits at high contrast, low background staining and high photostability in accord with immunohistochemical staining for most of the compounds. For immunohistochemical staining the antibodies anti-PHF Tau clone AT8 mAb for tau deposits and Amyloid A4 for A β plaques were used (Figure 2). Compound **7b** showed the best staining results for both tau and A β . First hints at a potential ability to discriminate between both kinds of protein deposits were observable for **7g** showing better staining results for tangles, **7i** labels plaques more intensely than NFTs. However, histological *in vitro* staining experiments provide only little information on absolute affinities and are not directly comparable with respect to prospective *in vivo* imaging. So we tested the compounds in a thiazine red displacement assay to determine their IC₅₀ values for aggregated tau and A β 40, displaying the required concentration of the tested ligand to replace thiazine red from half of the present binding sites. The measured IC₅₀ values confirm the trends of the qualitative *in vitro* staining experiments and are listed in table 1. Several compounds have an improved ability to discriminate between tau and A β *in vitro* and show generally higher affinities compared to the reference compound Methoxy-XO4 **7a**. How much more affine a marker has to be towards a favored target in comparison to a competing one has to be elucidated *in vivo*. Observations in *in vitro* assays concluded that a 20- to 50-fold higher selectivity towards the desired target would be preferable.⁹ According to this, **7g** holds potential for a tau selective marker *in vivo*.

3. Conclusion

In summary we developed a new synthesis for Methoxy-XO4 which allows for a derivatization of the distyrylbenzene-scaffold on the aromatic flanks of the molecule by the introduction of variable aromatic moieties. We demonstrated in a thiazine red displacement assay, that these derivatizations result in fluorescent molecules with improved binding properties to AD associated NFTs and amyloid plaques, which could also be shown in histochemical staining experiments on human brain tissue. One marker showed a 24-fold higher affinity for NFTs compared to A β plaques and thus holds potential to be profiled as a tau selective ligand *in vivo*.

a) NBS, AIBN, CCl₄, reflux; 42% b) triethyl phosphate; 97% c) KMnO₄, H₂O, 100 °C, 12h; 63% d) 1. SOCl₂, MeOH, 0 °C, 2h 2. K₂CO₃, reflux, 3h; 92% e) LiAlH₄, THF; 75% f) 1. SOCl₂, CH₂Cl₂ 2. triethyl phosphate; 86% g) KOrBu, aromatic aldehyde, DMF; 68%.

7		IC ₅₀	c log P	abs _{max} (nm)	em _{max} (nm)	tPSA	MW
		aggr. tau	aggr. Aβ				
a		246	140	6.11	344	450	344.40
b		1.8	13	6.86	359	430	398.54
c		366	120	6.37	352	445	508.70
d		inactive		3.61	368	430	314.38
e		35	24	5.42	326	441	383.27
f		Inactive		7.95	337	438	470.20
g		66	1597	6.39	375	440	534.19
h		6454	2535	6.6	368	428	348.39
i		Inactive		6.92	369	433	384.37
j		294	1020	5.05	396	441	412.38
k		6.4	3.7	5.09	350	437	488.53
l		94	18	n.d.	372	445	564.33

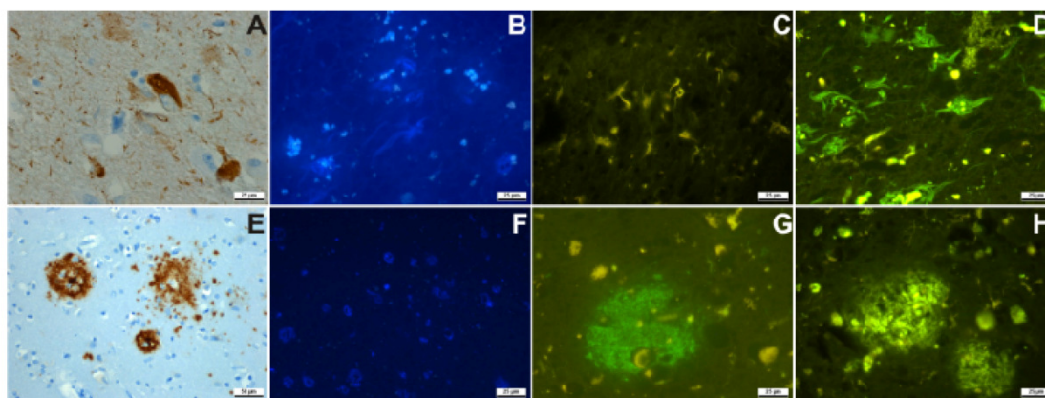


Figure 2. Immunohistochemical staining of NFTs (A) and amyloid plaques (E) and histochemical staining of both kinds of deposits with **7a** (B,F), **7b** (C,G) and **7k** (D,H).

1. In World Alzheimer Report, 2011.
2. Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, 48, 3030-3059.
3. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (Washington, DC, United States)* **2002**, 297, 353-356.
4. Gravit, L. Drugs: A tangled web of targets. *Nature (London, United Kingdom)* **2011**, 475, S9-S11.
5. Medeiros, R.; Baglietto-Vargas, D.; LaFerla, F. M. The role of Tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2011**, 17, 514-524.
6. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G.-f.; Estrada, S.; Ausen, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Annals of Neurology* **2004**, 55, 306-319.
7. Klunk, W. E.; Baeska, B. J.; Mathis, C. A.; Kajdasz, S. T.; McLellan, M. E.; Frosch, M. P.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Wang, Y.; Hyman, B. T. Imaging Aβ plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2002**, 61, 797-805.
8. Burgold, S.; Bittner, T.; Dorostkar Mario, M.; Kieser, D.; Fuhrmann, M.; Mitteregger, G.; Kretschmar, H.; Schmidt, B.; Herms, J. In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta neuropathologica* **2011**, 121, 327-35.
9. Schafer Kelsey, N.; Kim, S.; Matzavinos, A.; Kuret, J. Selectivity requirements for diagnostic imaging of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease: a simulation study. *NeuroImage* **2012**, 60, 1724-33.

Supporting Information for

Synthesis of Methoxy-XO4 Derivatives and their Evaluation in Alzheimer's Disease Models

Alexander Boländer^{a†}, Daniel Kieser^{a†}, Christoph Scholz^a, Roland Henyny-von Haußen^b,
Gerhard Mall^b, Valérie Goetschy^c, Christian Czech^c and Boris Schmidt^{a*}

^a*Clemens Schöpf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany*

^b*Center of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany*

^c*F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland*

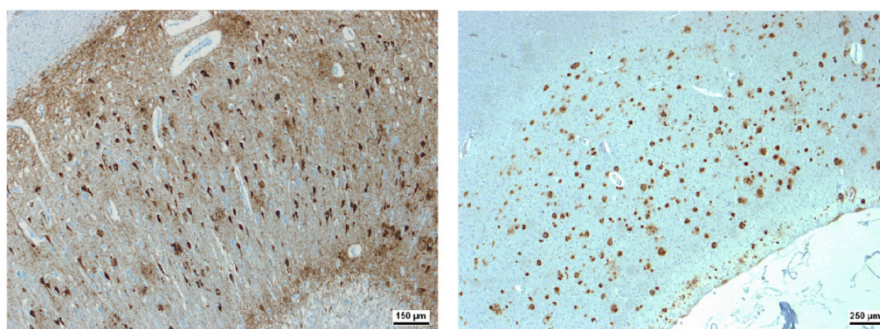
[†]*both authors contributed equally to this work, both first authors.*

Tissue Probe Preparation

Human hippocampal tissue fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin was cut to 4 µm sections in a microtome and mounted on standard microscope slides. Subsequent deparaffinization was carried out in xylol (15 min), ethanol 100 % (10 min), ethanol 96% (10 min) and ethanol 70% (10 min). Until subsequent processing the slides were stored in water.

Immunohistochemical Staining

Immunohistochemical staining was performed on 4 µm sections by using a Ventana Benchmark automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ) applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), TAU Ab-3 (Neomarkers, Fremont, CA) and Amyloid A4 (BAM10, Sigma, St. Louis, MO) and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ).



Immunohistochemical staining of tau fibrils (left, antibody AT8 mAb) and Aβ-plaques (right, antibody Amyloid A4).

Histochemical Staining with Fluorescent Dyes

The staining procedure comprises the following steps of brain section treatment: nucleus staining with acidic haemalm (10 min), blue annealing by water wash-up (5 min), application of the dye solution (2.5 mM) (10 min), ethanol wash-up, water-bath (5 min), 1% acetic acid-bath (15 min), water wash-up and covering with standard glass covers.

Light Microscopy and Fluorescence Microscopy

4 µm sections stained with fluorescence probes were analysed by indirect fluorescence microscopy using an Axioskop microscope with a HBO100 fluorescence illuminator (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the bandpass filter set 09 BP450-490, FT510, LP515, the filter set 02 G365, FT395, LP420 and the filter set 15 BP546, FT580, LP590 (all Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Digital image processing was done with a Leica DFC 300FX fluorescence camera (Leica Microsystems, Heerbrugg, CH) and the software ImageAcces Premium Version 5 (Imagic AG, Galttbrugg, CH).

Thiazine Red R Displacement Assay

Recombinant human microtubule associated tau protein purified from *E.coli* was aggregated at a concentration of 5 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM pH8, 24h at 37°C. Synthetic A β_{40} was aggregated at a concentration of 50 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM pH8, for three days at 37°C, under shaking at 150 rpm.

Thiazine Red R was added at the concentration corresponding to the K_d of the respective aggregated protein binding site to induce a fluorescent signal that can be inhibited by the addition of a displacer compound. (K_d for aggregated tau = 18 nM, K_d for aggregated A β = 49 nM).

To determine the affinity of a displacer compound to the *Thiazine Red R* binding sites of the aggregated proteins, the compound was added at different concentrations to the assay ranging from 0.1 nM to 10000 nM. For the inhibition curve, the compound was measured together with the aggregated proteins and *Thiazine Red R*. The fluorescence of some dyes overlapped with the fluorescence of *Thiazine Red R* when measured at 595 nm. Therefore, compounds were also measured together with the aggregated proteins, but without *Thiazine Red R* (autofluorescence curve) (Figure 1). Net-fluorescence was calculated by subtracting the fluorescence of the wells without *Thiazine Red R* from the fluorescence of wells containing *Thiazine Red R* (inhibition curve) (Figure 2). As negative control *Thiazine Red R* and aggregated protein was used. As positive control, *Thiazine Red R*, reference compound with known activity (see Table 1) and aggregated protein was used.

The assay was performed in Perkin Elmer OptiPlate 384, black, 45 mL assay volume. As assay buffer DPBS (no CaCl₂ no MgCl₂) (GIBCO N. 14020) was used. The tested compounds were diluted in DMSO and 2 μ L of the solution was added to the assay (5% DMSO final). The assay was started by the addition of the aggregated protein (competitive condition). The plates were shortly shaken (1 min with Sterico variomag teleshake) and incubated at room temperature for 30 min. Measurements were performed with En:Vision (Perkin Elmer), at Excitation 531 nm / Emission 595 nm.

Corresponding IC₅₀ values (inhibitory concentration for 50% decrease) were calculated using the Levenburg Marquardt algorithm:

$$y = A + ((B-A)/(1+((C/x)^D)))$$

Item	Description
A	The bottom plateau of the curve corresponds to the final minimum y value.
B	The top of the plateau of the curve corresponds to the final maximum y value.
C	The IC ₅₀ value represents the x value at which the half maximum y value is attained.

D	The slope factor. In this model a positive value is returned when y increases with increasing x and a negative value when y increases as x is decreasing.
x	Concentration of the tested compound (nM)
y	Net fluorescence in % of controls.

The obtained values are the average values of replicate experiments. The statistical presentation follows the guidelines laid out by G. Cumming, *J. Cell Biology*, **2007**, 177, 7-11.

Table 1: Determination of IC₅₀ values for different compounds on aggregated proteins using the *Thiazine Red R* assay. Data represent average of technical replicates.

	aggr. tau - IC ₅₀ (nM)	aggr. Aβ ₄₀ - IC ₅₀ (nM)
Evans Blue	1.0	89
Congo Red	5.4	14
Hondson 1d*	8.8	13
BSB	18	78
MeXO4	246	140
Crystal Violet	1545	1280
FDDNP	1635	1467
IMPY	2707	5671
PIB	3255	5190
AZD2184	9802	>10000
FENE	>10000	>10000
BF-158	>10000	>10000

* Compound Honson 1d from Honson et al, *Neurobiol Dis.* **2007**, 28(3), 251-60.

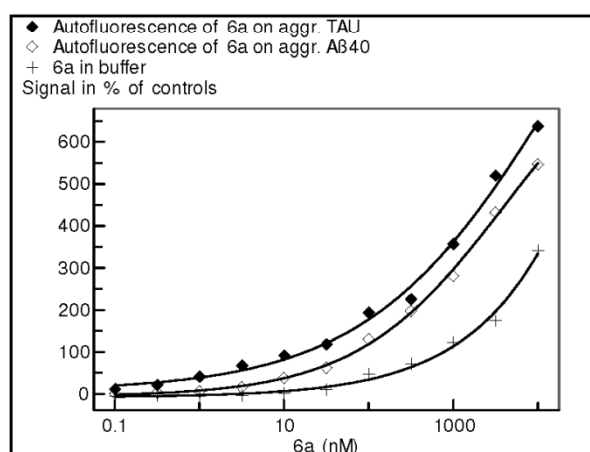


Figure 1: Fluorescence of **6a** in buffer or in presence of aggregated tau or aggregated A β ₄₀.

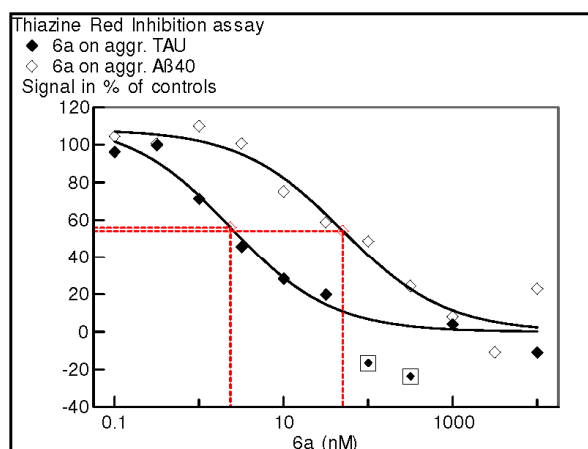
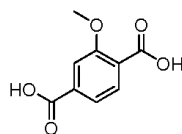


Figure 2: Inhibition curve in *Thiazine Red R* assay of the compound **6a**, with IC₅₀ determination for aggregated tau and aggregated A β ₄₀.

Experimental Conditions

All chemicals were purchased as reagent grade from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise noted. Proton (¹H NMR) and carbon (¹³C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker DRX 500 at 500 MHz and 125.75 MHz respectively at 293 K. The chemical shifts are given in parts per million (ppm) on the delta scale (δ) and are referenced to tetramethylsilane (δ = 0 ppm), ¹H NMR. Abbreviations for NMR data: s = singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; qi = quintet; dd = doublet of doublets; dt = doublet of triplets; dq = doublet of quartets; tt = triplet of triplets; m = multiplet. Mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 magnetic sector spectrometer. Thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck TLC silica gel 60 F 254 (0.2 mm) on Aluminium sheets. Silica gel columns for chromatography were prepared with E. Merck silica gel 60 (0.063-0.20 mesh ASTM). UV/vis-spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrometer, fluorescence spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu RF-1501 Spectrofluorophotometer. 2D fluorescence spectra were recorded on a Tecan Infifite® M1000.

2-Methoxybenzene-1,4-dioic acid 4



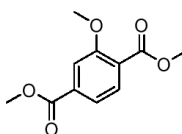
2,5 dimethylanisole (7.00 g, 46.0 mmol) was dissolved in hot water (700 ml). KMnO_4 (25.46 g, 161.0 mmol) was added in small portions over 1 h at 100°C to the vigorously stirred solution. The reaction mixture was stirred over night at 100°C . The precipitated MnO_2 was filtered off from the hot solution and washed twice with boiling water. The combined filtrates were acidified with concentrated hydrochloric acid and cooled to 7°C . The precipitated diacid was filtered off after 20 h (6.10 g, 63%).

melting point: 274.4°C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ = 7.69 (d, 4J = 7.8 Hz, 1H), 7.60-7.53 (m, 2H), 3.87 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ = 166.6, 166.3, 157.2, 134.2, 130.0, 125.4, 120.6, 112.2, 55.5 ppm.

Dimethyl 2-methoxyterephthalate 5



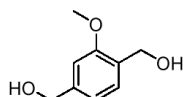
2-Methoxybenzene-1, 4-dioic acid **4** (6.00 g, 28.3 mmol) was dissolved in methanol (80 mL), cooled to 0°C and SOCl_2 was added dropwise under vigorous stirring. The reaction mixture was consecutively stirred for 30 min at 0°C , 2 h at RT and finally heated to reflux for 1 h. K_2CO_3 (2.99 g, 28.3 mmol) and Na_2CO_3 (3.90 g, 28.3 mmol) were added to the reaction mixture which was heated to reflux for 3 h. The reaction mixture was cooled to RT, quenched with ice cold water and extracted with dichloromethane. The combined organic phases were consecutively washed with 2N NaOH_{aq} and brine (three times each), dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated in vacuum to provide 5.30 g (92%) of dimethyl 2-methoxyterephthalate **5** as colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ = 7.73 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.81 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ = 165.3, 165.0, 157.3, 133.3, 130.4, 124.2, 120.5, 112.1, 55.6, 52.2, 51.9 ppm.

MS (m/z, 70eV, EI) = 225 (M^+), 193, 180, 149.

(2-Methoxy-1,4-phenylene)-dimethanol 6



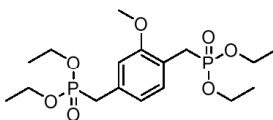
Dimethyl 2-methoxyterephthalate **5** (5.30 g, 23.6 mmol in 25 mL dry tetrahydrofuran) was added dropwise to a stirred suspension of LiAlH_4 (5.40 g, 141.9 mmol) in abs. THF (15 mL). The reaction mixture was heated to reflux for 1 h then cooled to RT. To the suspension were added slowly 6 mL of water, then 12 mL of 10 % NaOH_{aq} and again 24 mL of water: The suspension was stirred for 1 h. The aluminum salts were filtered off using a pressed plug of Celite. The combined filtrates were acidified with 2N H_2SO_4 , extracted with ethylacetate five times. The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuo to provide 3.4 g (75%) of (2-methoxy-1, 4-phenylene) dimethanol **6**.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.18 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H), 6.86-6.81 (m, 2H), 4.71-4.52 (m, 4H), 3.81 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 157.5, 142.2, 128.6, 128.2, 118.8, 108.9, 65.0, 55.3 ppm.

MS (m/z, 70eV, EI) = 219 (M^+ + Na)

Tetraethyl (2-methoxy-1,4-phenylene)bis(methylene)diphosphonate 3



(2-methoxy-1, 4-phenylene) dimethanol **6** (3.4 g, 15.5 mmol) was suspended in dichloromethane and SOCl_2 (3.05 mL, 43.4 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at RT over night. The reaction mixture was filtered over silica, washed with DCM twice and the solvent was removed under vacuum. The resulting dichloride was dissolved in triethylphosphite (20 mL) and stirred 16 h at 140°C . The excess of triethylphosphite was removed via distillation at 2 mbar at 150°C to provide 5.43 g (86%) of tetraethyl (2-methoxy-

1,4 -phenylene)bis(methylene)diphosphonate **3** as clear oil, slowly crystallizing as colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.22 (dd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 2.7 Hz, 1H), 6.83-6.79 (m, 2H), 4.06-3.93 (m, 8H), 3.81 (s, 3H), 3.22 (d, ³*J* = 1.1 Hz, 1H), 3.15 (d, ³*J* = 1.1 Hz, 1H), 3.13 (d, ³*J* = 1.1 Hz, 1H), 3.06 (d, ³*J* = 1.1 Hz, 1H), 1.24-1.18 (m, 12H) ppm.

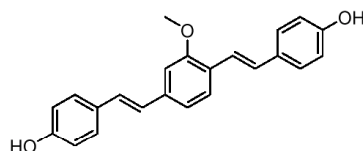
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 157.2, 131.7, 131.1, 121.9, 112.9, 62.1, 55.5, 33.8 (d, *J* = 136.7 Hz), 26.4 (d, *J* = 137.8 Hz), 16.3 ppm.

MS (*m/z*, 70eV, EI) = 408 (*M*⁺ + Na), 271

Synthesis of bisphenolic distyrylbenzene-derivatives **7**

An oven-dried (140°C, 24 h) 2.5 mL Wheaton-vial was charged with KO^tBu (430.5 mg; 0.83 mmol), dry DMF (1 mL), and tetraethyl (2-methoxy-1,4-phenylene)bis(methylene)-diphosphonate (200 mg, 0.48 mmol) dissolved in 0.5 mL DMF. The mixture was stirred at ambient temperature for 30 min. The corresponding aldehyde (0.83 mmol dissolved in 0.5 mL dry DMF) was added dropwise to the suspension. The reaction mixture was stirred at ambient temperature over night. The reaction mixture was transferred with 20 mL of 1N hydrochloric acid to an extraction funnel and extracted with ethyl acetate (3x 50 mL). The combined organic phases were consecutively washed with 1N hydrochloric acid, brine, dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate; 2/1) to yield the desired product.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-methoxy-1,4-phenylene)bis(ethene-2,1-diyl)diphenol (Methoxy-XO4) 7a

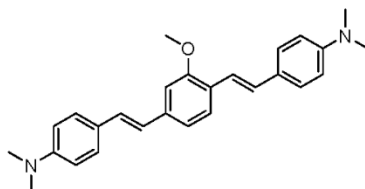


¹H-NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 7.57 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H), 7.42 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.37 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, ³*J* = 16.5 Hz, 2H), 7.17 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, ⁴*J* = 1.5 Hz, ³*J* = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (d, ³*J* = 16.5 Hz, 1H), 7.00 (d, ³*J* = 16.5 Hz, 1H), 6.77 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 6.76 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO, 75 MHz): δ = 157.2, 157.1, 156.3, 137.6, 128.6, 128.2, 127.8, 127.6, 125.8, 125.0, 124.8, 119.3, 118.8, 115.5, 108.5, 55.4 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z = 344 (M^+)

4-(4-(4-(Dimethylamino)styryl)-3-methoxystyryl)-N,N-dimethylbenzamine 7b

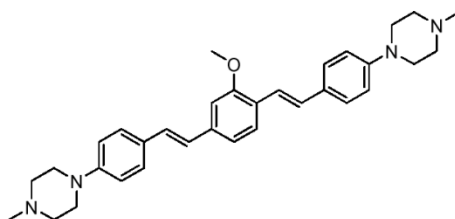


HPLC tR = 4.26 min.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 7.49 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.37 (m, 4H), 7.25 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.06-6.99 (m, 4H), 6.83-6.75 (m, 3H), 6.64 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.96 (s, 12H) ppm.

MS (EI) m/z = 398.4 [M]⁺.

1-(4-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)styryl)-2-methoxystyryl)phenyl)-4-methylpiperazine 7c

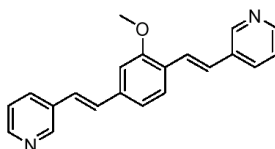


HPLC tR = 4.65 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.54 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, ³J = 8.2, 8.2 Hz, 4H), 7.32 (d, ³J = 16.5 Hz, 1H), 7.05-7.02 (m, 5H), 6.93-6.88 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.36-3.30 (m, 8H), 2.72-2.67 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ = 155.8, 149.3, 149.0, 136.8, 128.9, 128.0, 127.3, 127.0, 126.5, 125.5, 124.6, 124.2, 123.5, 123.3, 122.4, 122.2, 118.1, 107.4, 54.1 ppm.

3-(3-Methoxy-4-((E)-2-(pyridin-3-yl)vinyl)styryl)pyridine **7d**



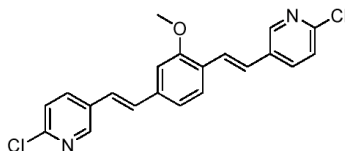
HPLC tR = 1.44 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.76 (s, 2H), 8.51 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H), 8.48 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H), 7.95 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.60 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (d, ³J = 16.6 Hz, 1H), 7.37-7.32 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 5H), 3.98 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 155.9, 146.5, 146.4, 145.7, 145.3, 136.4, 132.7, 132.3, 131.7, 129.5, 125.5, 124.6, 123.5, 123.3, 122.4, 122.2, 118.1, 107.4, 54.1 ppm.

MS (ESI) m/z = 314 [M]⁺, 299.

5-(4-((E)-2-(6-Chloropyridin-3-yl)vinyl)-2-methoxystyryl)-2-chloropyridine **7e**



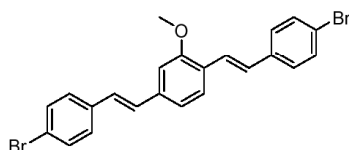
HPLC tR = 9.33 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.43 (d, ³J = 2.4 Hz, 1H), 8.40 (d, ³J = 2.4 Hz, 1H), 7.78-7.73 (m, 2H), 7.51 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 7.41 (d, ³J = 16.6 Hz, 1H), 7.26 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.23 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.08-7.06 (m, 2H), 7.04 (d, ³J = 2.8 Hz, 1H), 7.00 (d, ³J = 3.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.90 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 156.3, 149.1, 148.8, 147.3, 147.2, 136.7, 134.3, 134.2, 131.6, 130.9, 130.1, 126.1, 124.9, 124.8, 123.3, 123.2, 123.1, 122.9, 118.6, 107.9, 54.6 ppm.

MS (EI) m/z = 382 [M]⁺, 367.

1,4-Bis(4-bromostyryl)-2-methoxyneazole **7f**



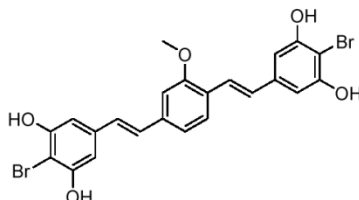
HPLC tR = 9.85 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.48 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 4H), 7.32-7.29 (m, 4H), 7.04 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.00-6.93 (m, 4H), 3.87 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 157.2, 137.8, 136.9, 136.1, 131.8, 131.7, 129.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 126.7, 125.8, 123.8, 121.4, 121.1, 119.4, 108.8, 55.6 ppm.

MS (EI) m/z = 470 (468, 472) $[M]^+$.

4-(4-(3,5-Dibromo-4-hydroxystyryl)-3-methoxystyryl)-2,6-dibromophenol **7g**



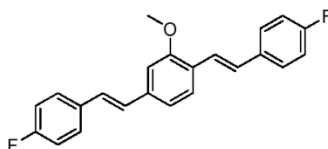
HPLC t_R = 9.85 min.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 7.81 (s, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.58 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H), 7.28 (d, 3J = 16.5 Hz, 1H), 7.21 (d, 3J = 10.6 Hz, 3H), 7.15 (dd, 3J = 16.0, 12.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 156.7, 150.0, 149.8, 137.7, 132.5, 132.0, 130.0, 129.8, 128.3, 126.7, 125.9, 125.8, 124.7, 122.9, 119.2, 112.3, 109.1, 55.5 ppm.

MS (EI) m/z = 660 $[M]^+$.

1,4-Bis(4-fluorostyryl)-2-methoxybenzene **7h**



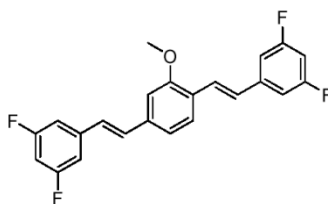
HPLC t_R = 10.13 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.56 (d, 3J = 8.0 Hz, 1H), 7.51-7.46 (m, 4H), 7.38 (d, 3J = 16.5 Hz, 1H), 7.12-7.09 (m, 2H), 7.06-7.02 (m, 6H), 6.90-6.87 (m, 1H), 3.95 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 161.4, 157.1, 137.8, 134.2, 133.4, 128.3, 128.3, 128.0, 128.0, 127.8, 127.8, 127.5, 126.5, 125.9, 122.9, 119.3, 115.8, 115.6, 115.4, 114.7, 108.7, 55.6 ppm.

MS (EI) m/z = 348 $[M]^+$.

1-(4-(3,5-Difluorostyryl)-3-methoxystyryl)-3,5-difluorobenzene **7i**

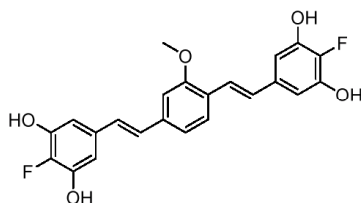


HPLC t_R = 10.28 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.48 (d, 3J = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, 3J = 16.4 Hz, 1H), 7.05-7.02 (m, 2H), 6.99-6.91 (m, 7H), 6.65-6.58 (m, 2H), 3.88 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 163.3, 163.2, 161.3, 161.2, 156.4, 140.4, 139.6, 136.6, 129.9, 126.1, 125.9, 124.6, 118.6, 108.2, 108.1, 108.0, 107.9, 101.9, 101.9, 101.3, 54.6 ppm.
MS (EI) m/z = 384 [M]⁺.

4-(4-(3,5-Difluoro-4-hydroxystyryl)-3-methoxystyryl)-2,6-difluorophenole 7j



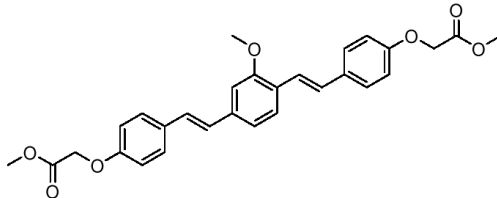
HPLC tR = 7.93 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.41 (d, ³J = 8.01 Hz, 1H), 7.18 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H), 6.99 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 6.94 (d, ³J = 7.9 Hz, 4H), 6.88 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 156.0, 152.7, 150.7, 136.5, 132.8, 132.7, 132.4, 128.1, 128.0, 127.2, 127.1, 127.0, 126.0, 125.8, 125.5, 125.1, 124.5, 121.7, 118.2, 108.4, 107.6, 54.5 ppm.

MS (EI) m/z = 416 [M]⁺, 276.

2,2'-(4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-Methoxy-1,4-phenylene)bis(ethendiyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxy)diacetate 7k



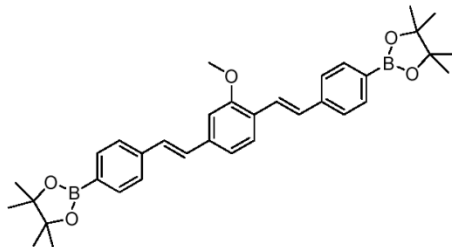
HPLC tR = 9.05 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.47 (d, ³J = 8.14 Hz, 1H), 7.41 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.39 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.28 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H), 7.03 (d, ³J = 8.14 Hz, 1H), 7.01 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H), 6.99 (d, ³J = 1.5 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.90 (d, ³J = 15.9 Hz, 1H), 6.84 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.83 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 168.4, 168.3, 168.3, 156.5, 156.4, 156.2, 155.9, 136.8, 131.0, 130.3, 127.1, 126.8, 126.7, 126.2, 125.3, 124.9, 120.8, 118.2, 113.9, 113.8, 107.6, 64.4, 64.3, 54.5, 51.3, 51.2 ppm.

MS (EI) m/z = 488 [M]⁺.

2,2'-(4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(2-Methoxy-1,4-phenylene)bis(ethene-2,1-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane) **71**



HPLC tR = 6.65 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.80 (t, ³J = 8.80 Hz, 4H), 7.60 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, ³J = 7.0 Hz, 4H), 7.17 (d, ³J = 16.3 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J = 16.3 Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 1.36 (s, 24H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 157.2, 140.7, 139.9, 137.9, 135.2, 135.1, 131.7, 129.5, 129.0, 128.7, 126.7, 126.1, 125.9, 125.8, 124.1, 119.5, 108.84, 83.8, 55.6, 24.9 ppm.

MS (EI) m/z = 564 [M]⁺.

3.1.5. Fluoreszente Retinasonden für die Diagnostik der Alzheimer'schen Krankheit

Der Inhalt dieses Kapitels wurde am 05. April 2012 zum internationalen Patent angemeldet.

Internationale Veröffentlichungsnummer: WO2012/041292 A2

Patentanmelder: Klinikum Darmstadt GmbH, Ludwig-Maximilians Universität, Technische Universität Darmstadt

Titel: Compounds for diagnosing neurodegenerative diseases at the retina

Erfinder: Boris Schmidt, Daniel Kieser, Roland Heyny-von Haußen, Jochen Herms, Alexander Boländer

Zusammenfassung

In der vorliegenden Erfindung werden Substanzen mit hoher Affinität für die pathologischen Kennzeichen der Alzheimer'schen Krankheit und anderer neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben. Dies bezieht sich auf Aggregate des Proteins A β und des Proteins Tau für die Alzheimer-Demenz und auf das Protein α -Synuclein bei Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Verschiebung, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Sie sollen für Differentialdiagnosen von

neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden, indem sie nach Verabreichung in geringer Dosierung eine Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden Pathogene an der Retina erzeugen.

Das Verfahren ermöglicht dadurch mit im Vergleich zu anderen weniger aussagekräftigen Verfahren wie CT, PET und SPECT eine preiswerte ophthalmologische *in vivo* Untersuchung. Dabei ist eine Verbindung von Frühdiagnose und generellen Vorsorgeuntersuchungen auch für große Patientengruppen möglich.

Die folgenden Seiten enthalten Auszüge aus dieser Patentanmeldung.

Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen an der Retina

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen mit Affinität für das A β -Protein, für α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise
10 fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Ferner betrifft die
15 vorliegende Erfindung die Verwendung solcher Verbindungen zu Diagnosezwecken sowie ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen.

Die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson bringt für die Patienten erhebliche Vorteile in der Therapie.
20 Allerdings ist die sichere Diagnose des Morbus Alzheimer, insbesondere die der frühen Krankheitsstadien, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch postmortale mikroskopische Untersuchung sicher möglich.

Die aktuellen Methoden am lebenden Alzheimer-Patienten sind heterogen und stützen sich auf Fremdanamnese, bildgebende Verfahren, kognitive Tests und Ausschluss anderer neurodegenerativer Erkrankungen. Die Diagnose am lebenden
25 Patienten, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung, ist oft nicht klar von anderen Demenzen abzugrenzen. Wenn erste Symptome im Kurzzeitgedächtnis auftreten, sind meist bereits erhebliche pathologische Veränderungen im Gehirn erfolgt. Zum
30 Teil können diese Veränderungen mit so genannten nicht invasiven Untersuchungsmethoden erkannt werden, wie z.B. Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) und Positronenemissionstomografie (PET).

WO2009155017 offenbart radiopharmazeutische Zusammensetzungen, die eine
35 hohe Affinität für Amyloid-Plaques besitzen und über Positronenemissionstomografie nachgewiesen werden.

WO2007136996 beschreibt cyanine Farbstoffe, die zur Markierung von Biomolekülen genutzt werden, z.B. für die *in vivo* Diagnose von Krebs.

US20020133019 offenbart Thioflavin-Derivate für die ante mortem *in vivo* Diagnose unter anderem von Alzheimer. Markierte Thioflavine binden dabei an Amyloid-Plaques und werden über Gamma-Imaging, MRT oder NMR-Spektroskopie
5 detektiert.

Keine dieser Methoden und Farbstoffe ist in der Lage, frühe Stadien der Krankheiten zu erkennen und benötigt im Falle der Positronenemissionstomografie eine sehr teure und nicht weit verbreitete Infrastruktur.
10

Die Entnahme von Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) zum Nachweis erhöhter A β -Werte erfordert eine Rückenmarkspunktion. Es stellt damit eine invasive Untersuchungsmethode dar, ist mit einer nicht zu vernachlässigenden Komplikationsrate verbunden und somit insbesondere nicht für
15 Vorsorgeuntersuchungen geeignet.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, geeignete diagnostische Sonden für den Nachweis von neurodegenerativen Erkrankungen bereitzustellen, die über ein optisches Detektionsverfahren nachgewiesen werden können.
20

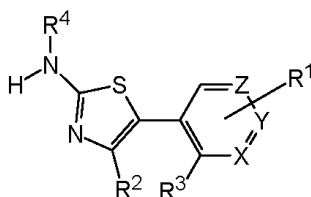
Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch die Verwendung von bestimmten Verbindungen zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung weisen diese Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) auf:

- 25 a) eine > 10fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- 30 d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
- e) einen $\log P$ -Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

Insbesondere weisen Verbindungen der folgenden Stoffklassen drei und mehr der
35 vorgenannten Eigenschaften auf, so dass die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen betrifft, welche eine Affinität zum A β -Protein, α -Synuclein und/oder

Tau-PHF-Aggregaten besitzen und daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind.

- 5 Verbindungen der Substanzklasse der Arylaminothiazole umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

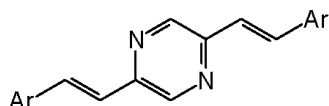
X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

- 10 R¹, R², R³, R⁴ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl, C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃,
 15 -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂,
 20 -CO-N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl), -NH(C₂-C₆-Alkenyl), -NH(C₂-C₆-Alkynyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -SO-C₁-C₆-Alkyl, -SO-C₂-C₆-Alkenyl, -SO-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂-C₁-C₆-Alkyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₃H, -SO₃-C₁-C₆-Alkyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO-C₁-C₆-Alkyl,
 25 Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.
- 30 Verbindungen der Substanzklasse der 4,6-Divinylpyrimidine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:

- $N(C_2-C_6-Alkenyl)_2$, $-CO-N(C_2-C_6-Alkyl)_2$, $-NH(C_1-C_6-Alkyl)$, $-NH(C_2-C_6-Alkenyl)$, $-NH(C_2-C_6-Alkyl)$, $-N(C_1-C_6-Alkyl)_2$, $-N(C_2-C_6-Alkenyl)_2$, $-N(C_2-C_6-Alkyl)_2$, $-SO-C_1-C_6-Alkyl$, $-SO-C_2-C_6-Alkenyl$, $-SO-C_2-C_6-Alkyl$, $-SO_2-C_1-C_6-Alkyl$, $-SO_2-C_2-C_6-Alkenyl$, $-SO_2-C_2-C_6-Alkyl$, $-SO_3H$, $-SO_3-C_1-C_6-Alkyl$, $-SO_3-C_2-C_6-Alkenyl$, $-SO_3-C_2-C_6-Alkyl$, $-SO_2NH_2$, $-O-COO-C_1-C_6-Alkyl$, $-NH-CO-NH_2$, $-NH-CO-NH-C_1-C_6-Alkyl$, $-NH-CO-N(C_1-C_6-Alkyl)_2$, $-Ph$, $-CH_2-Ph$ oder $-CH=CH-Ph$ sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.

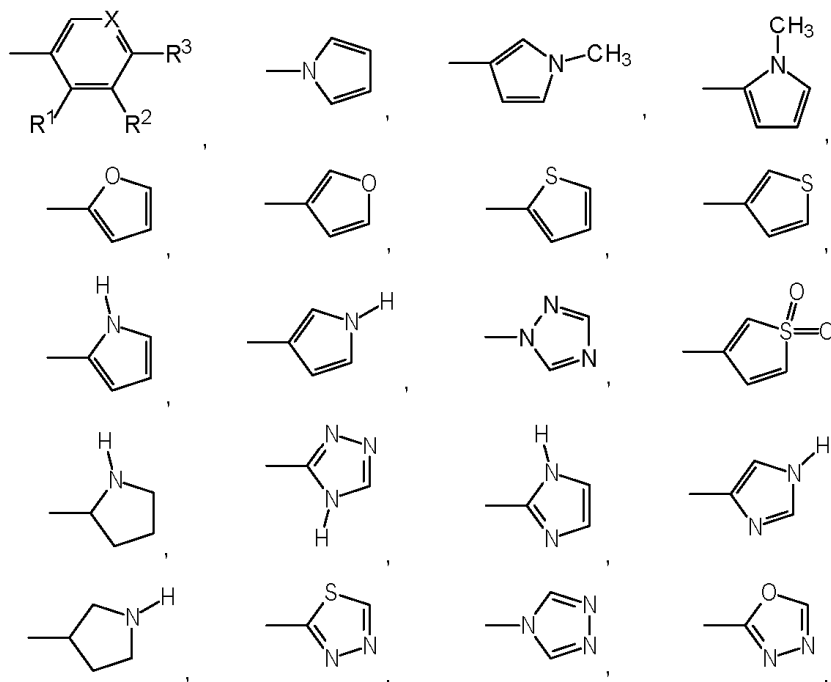
10

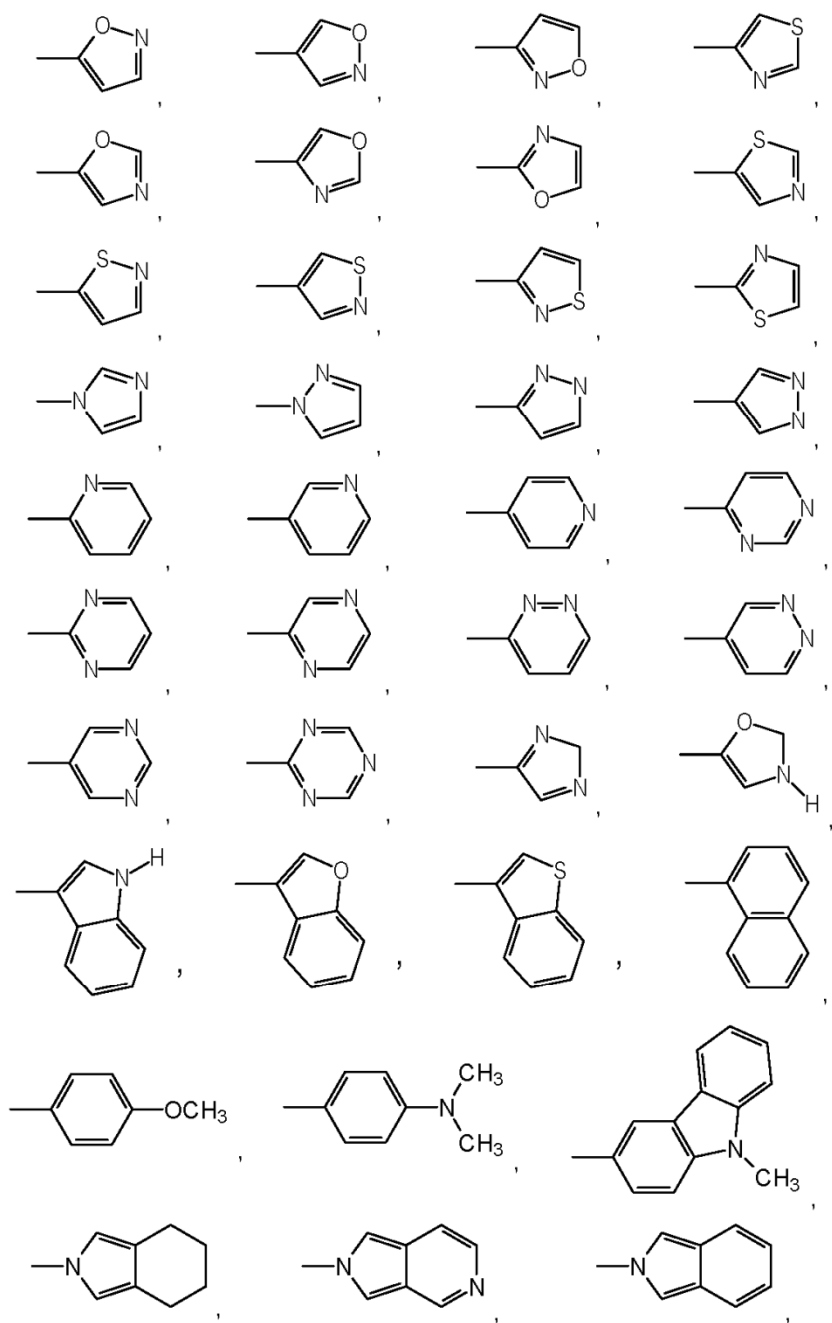
Verbindungen der Substanzklasse der 2,5-Divinylpyrazine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:

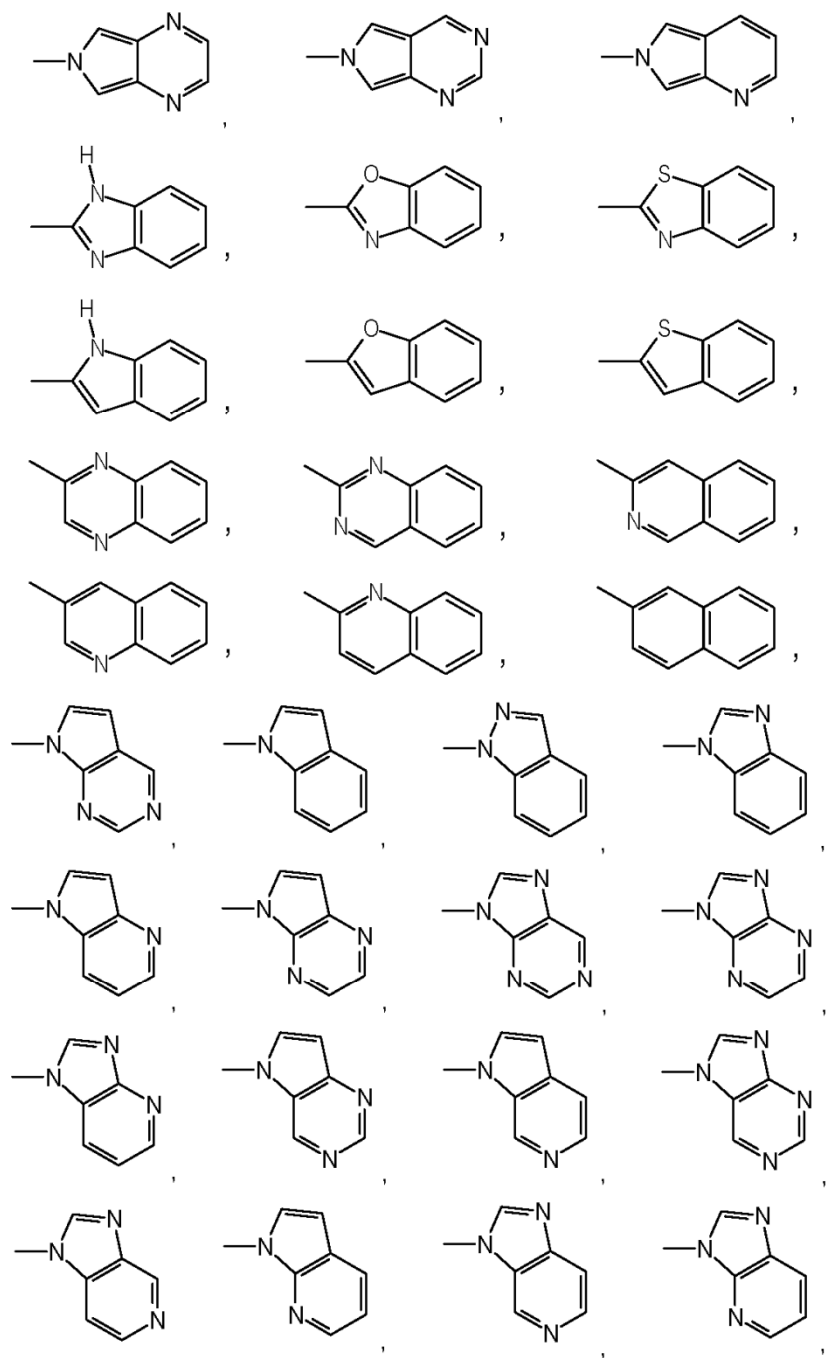


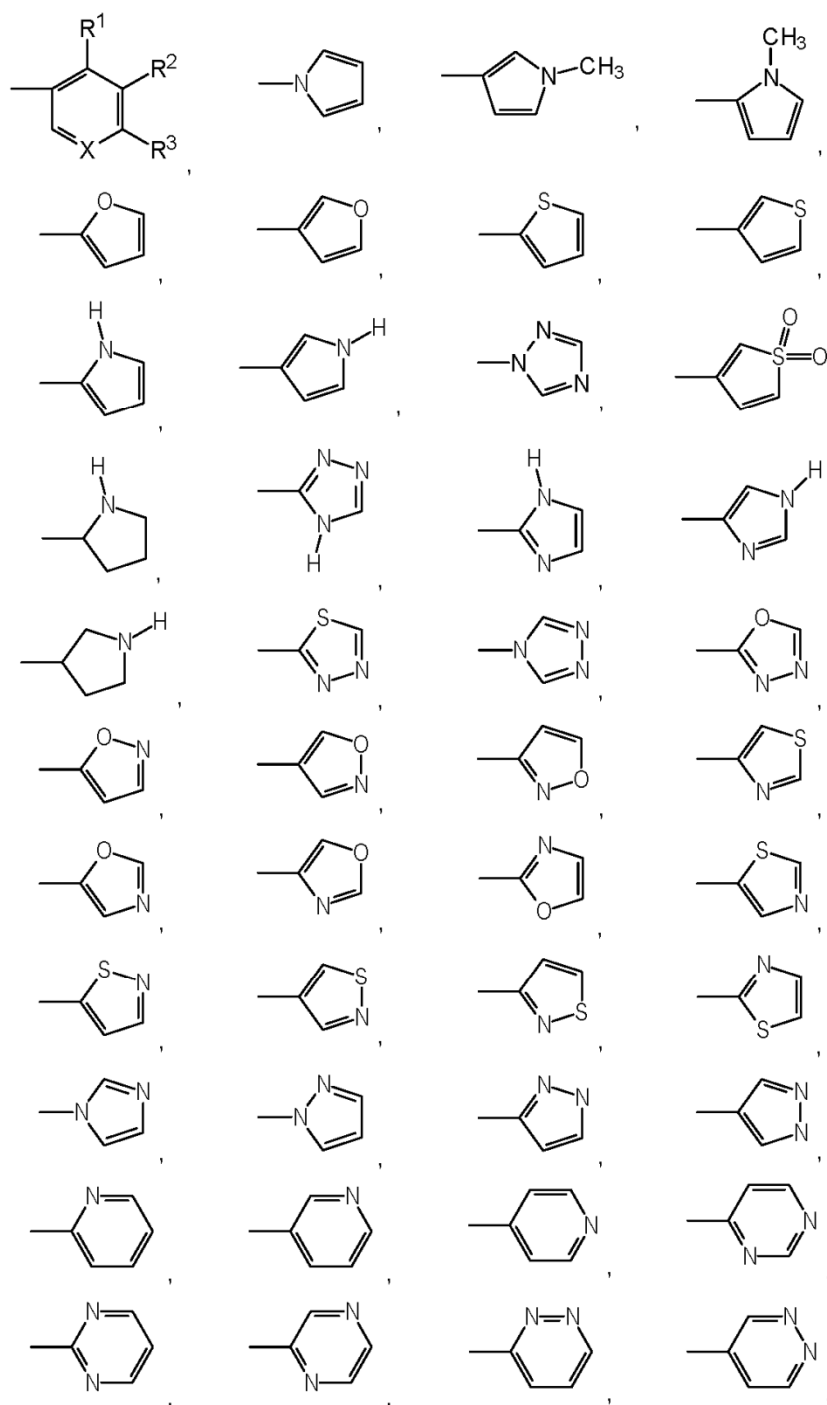
worin

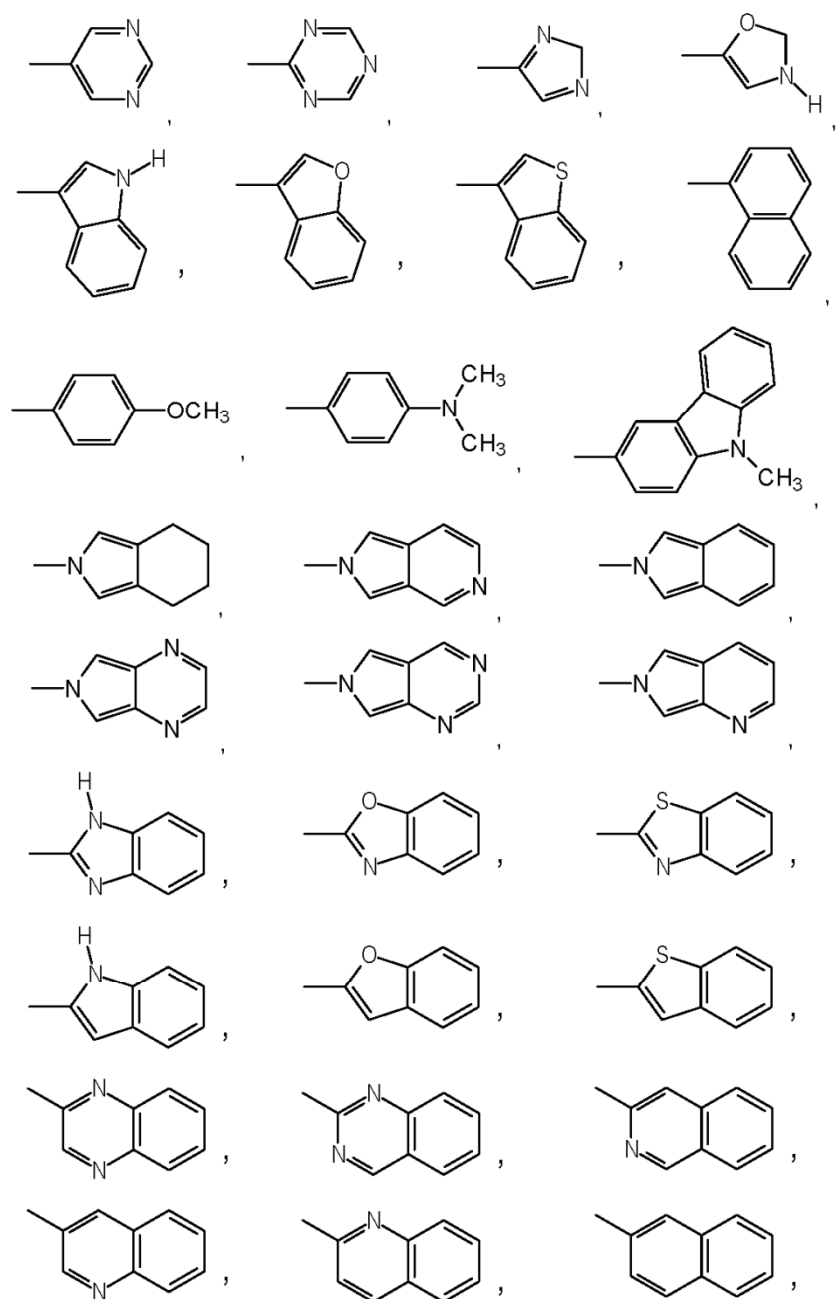
- 15 Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:

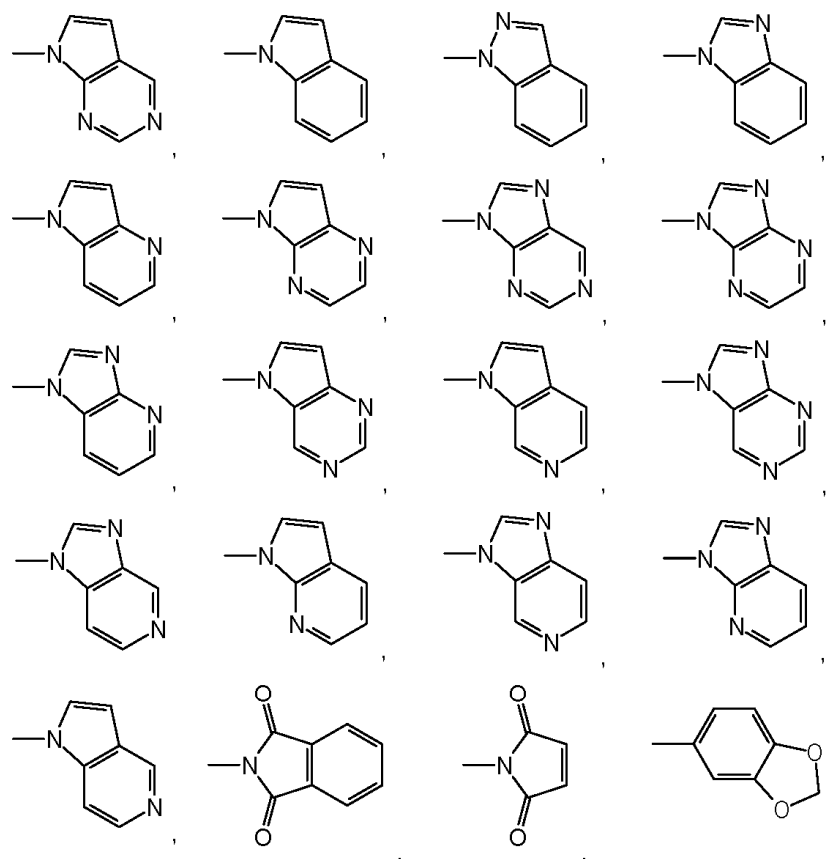












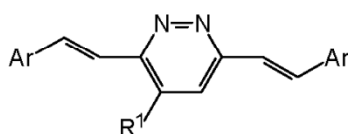
worin

X Kohlenstoff oder Stickstoff bedeutet und

- R¹, R² und R³ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl, C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃, -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl), -NH(C₂-C₆-Alkenyl), -NH(C₂-C₆-Alkynyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -SO-C₁-C₆-Alkyl, -SO-C₂-C₆-Alkenyl, -SO-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂-C₁-

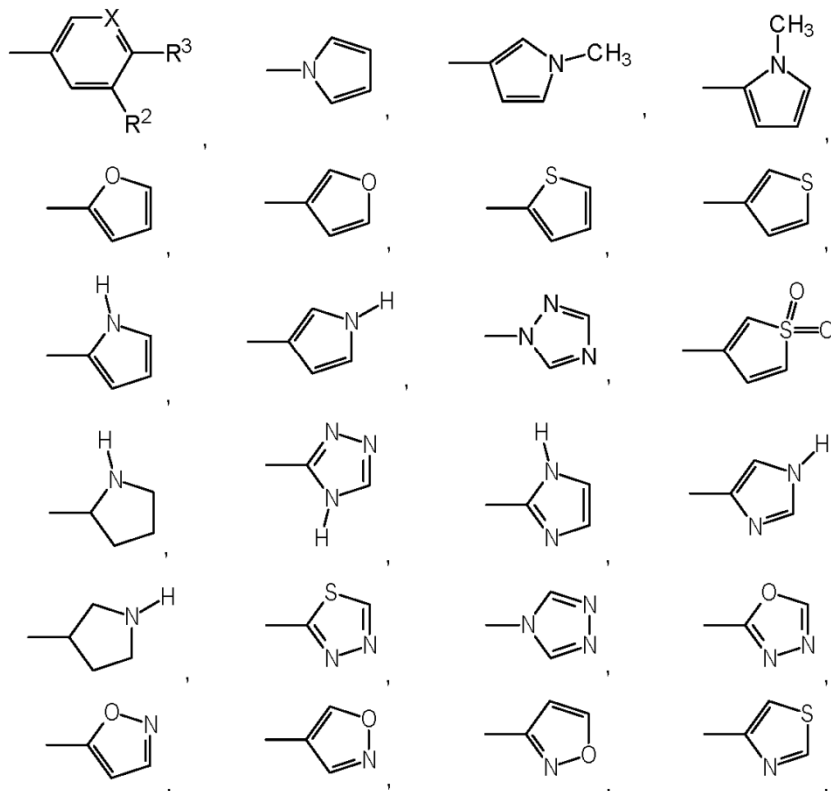
C₆-Alkyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₃H, -SO₃-C₁-C₆-Alkyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.

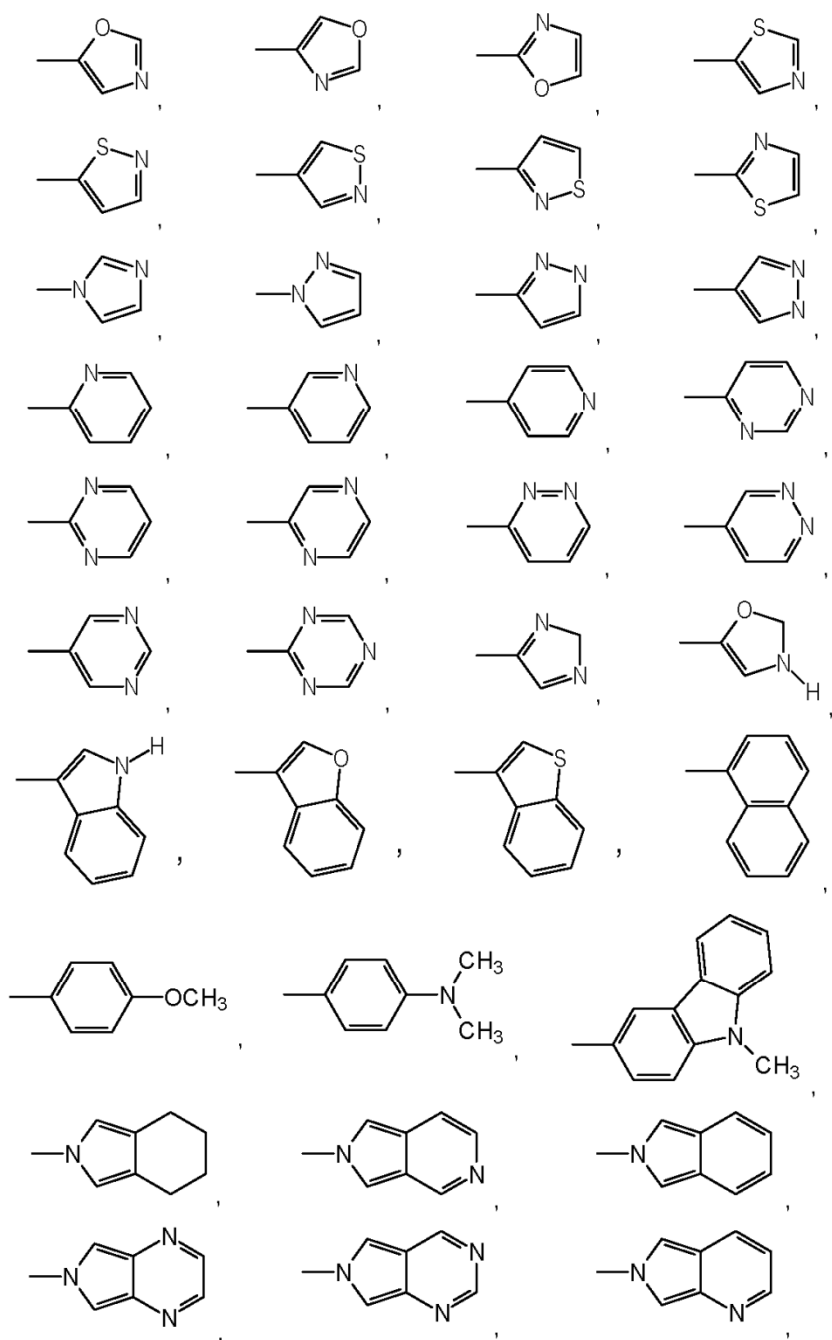
Verbindungen der Substanzklasse der 3,6-Divinylpyridazine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:

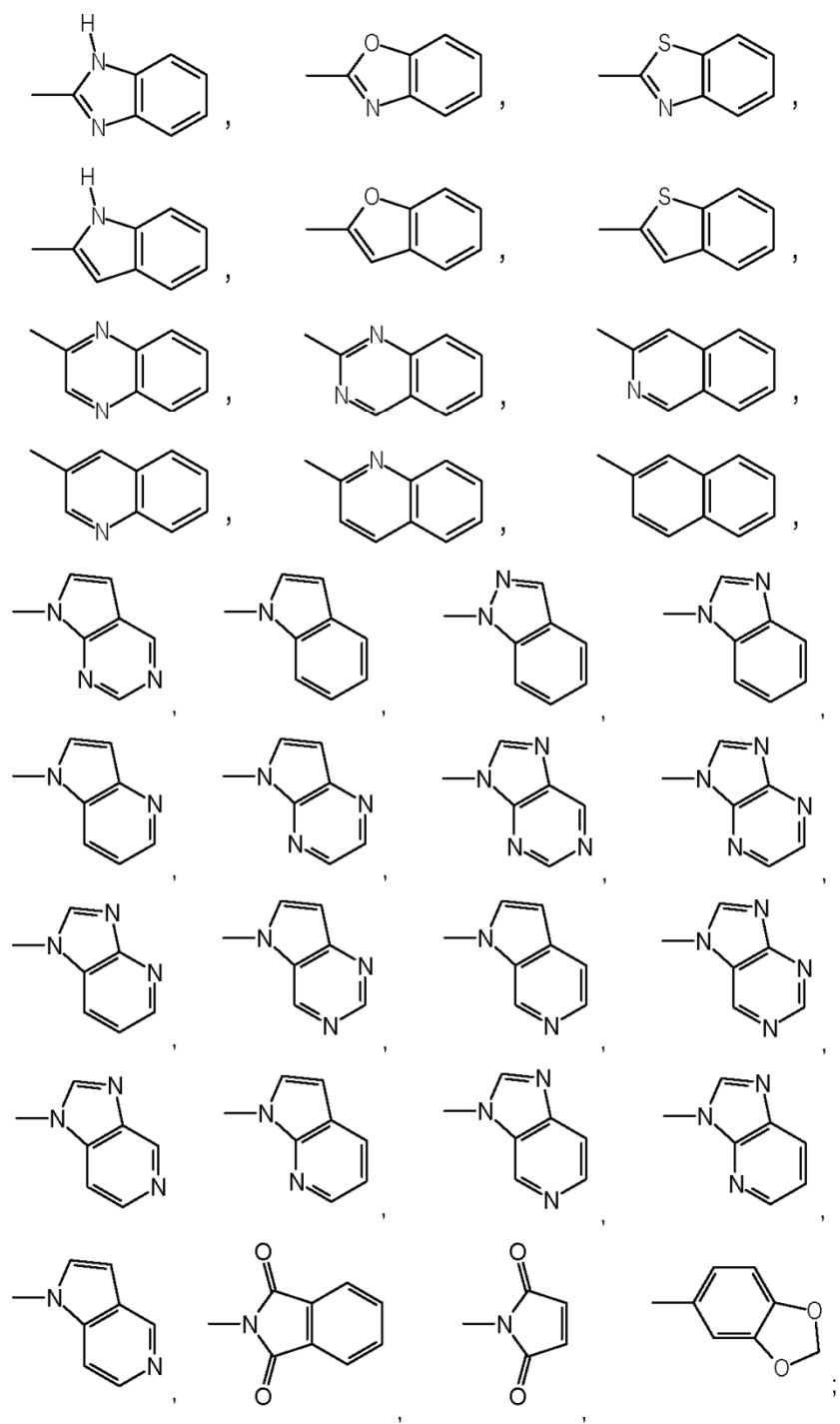


worin

Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:







- $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-$
5 $\text{C}(\text{C}_3\text{H}_7)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$,
 $-\text{C}(\text{C}_4\text{H}_9)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{C}_3\text{H}_7)=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{C}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{C}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]=\text{CH}_2$, $-\text{C}[\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)]=\text{CH}_2$, $-\text{C}[\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2]=\text{CH}_2$,
 $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_4-$
 $\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
10 $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$
15 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
 $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$
 $\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$,
20 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{C}-$
 CH_3 , $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
25 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}(\text{C}_3\text{H}_7)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})_2$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
30 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{C}\equiv\text{CH})_2-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})_2$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$.

Besonders bevorzugt sind Substituenten aus der Gruppe der Phenole, Methylanilin, Dimethylanilin, Methyl-2-aminopyridin, Dimethyl-2-aminopyridin.

35

Alle erfindungsgemäß eingesetzten und verwendbaren Verbindungen der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder der Diarylharnstoffe verfügen vorzugsweise über mindestens zwei und weiter bevorzugt

über drei aromatische Ringe, welche direkt oder über eine Vinylbrücke oder über eine Harnstoffbrücke miteinander verbunden sind. Besonders bevorzugt sind Verbindungen mit drei aromatischen Ringen, welche über Vinylbrücken miteinander verbunden sind, wodurch sich ausgedehnte π -Elektronensysteme ergeben.

- 5 Besonders bevorzugt sind Verbindungen der vorgenannten Klassen mit delokalisierten Elektronen über mindestens 15 beteiligte Atome. Weiter bevorzugt sind Verbindungen mit π -Elektronensystemen, welche sich über mindestens 20 Atome erstrecken und insbesondere bevorzugt sind delokalisierte Elektronensysteme, welche sich über 22 oder mehr Atome erstrecken.

10

Bei den 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen und den 2,5-Divinylpyrazinen sind 22 Atome am π -Elektronensystem beteiligt, wenn Ar für einen 6-Ring steht, und das π -Elektronensystem erstreckt sich über 20 Atome, wenn Ar ein 5-Ring ist.

- 15 Die oben genannten Verbindungen können als fluoreszente Sonden zur Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Hierbei sind alle Arten von Erkrankungen eingeschlossen, die zu einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen führen. Die Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen basiert sowohl auf der klinischen Präsentation mit topographisch typischer Verteilung und
20 involviertem Zelltyp des degenerativen Prozesses als auch auf der Ablagerung von strukturell veränderten Proteinen wie Prion-Protein, Tau, Beta-Amyloid, Alpha-Synuclein, TDP-43 und/oder Huntington. Die Fluoreszenz der erfindungsgemäßen Substanzen wird bei Bindung an die Zielproteine entweder verstärkt oder signifikant verschoben. Dadurch ist erst das notwendige Signal-Rausch-Verhältnis möglich.

25

Der Begriff „Diagnostik oder Diagnose“ umfasst dabei die Bereiche *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* Diagnostik. Generell dient die Diagnostik oder Diagnose ausschließlich oder hauptsächlich dazu, Informationen zu liefern. Diese Informationen geben Aufschluss über:

- 30
- physiologische oder pathologische Zustände oder
 - angeborene Anomalien oder
 - dienen zur Prüfung auf Unbedenklichkeit und/oder Verträglichkeit bei potentiellen Empfängern und/oder
 - zur Überwachung therapeutischer Maßnahmen.

35

Bei der *in vitro* bzw. *ex vivo* Diagnostik werden vom menschlichen Körper stammende Proben verwendet, wie z.B. Blut, Serum, Plasma, Seminalflüssigkeit, Spinalflüssigkeit, peritoneale Flüssigkeit, Speichel, Sputum, Tränenflüssigkeit, Urin, Biopsiematerial oder Gewebespenden. Das Gewinnen einer solchen Probe kann,

muss aber nicht, Teil des diagnostischen Verfahrens sein. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das Gewinnen der zur Diagnose vorgesehenen Probe kein Schritt des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens.

- 5 Bei der *in vivo* Diagnostik werden die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina nachgewiesen.

- Die erfindungsgemäßen Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe werden besonders bevorzugt zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone oder Diarylharnstoffe in der Retina nachgewiesen.

- Die Erfindung umfasst insbesondere ein Verfahren zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen umfassend,
- 20 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
- b) Diagnostizieren der (vermuteten) neurodegenerativen Erkrankung in der Retina.

- Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur *in vivo* Detektion von A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregaten umfassend,
- 30 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
- b) Detektieren der (gebundenen) A β -Proteine, α -Synucleine oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina.

- 35 Die hierin genannten Verbindungen wirken vorzugsweise als fluoreszente Sonden. Sie besitzen eine (vorzugsweise hohe) Affinität für das A β -Protein, α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate und binden - vorzugsweise spezifisch - an diese. Die Bindung der erfindungsgemäßen Verbindungen an eines oder mehrere der oben

- genannten Zielproteine ist optisch detektierbar. Die Extinktionszunahme bei Bindung an das Zielprotein ist bevorzugt gekennzeichnet durch eine >10x Zunahme der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber der freien Verbindung und kann experimentell z.B. durch die Verringerung des Hintergrundrauschens bestimmt werden. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ aufweisen. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bz.w der Extinktion erfolgt in bestimmten Ausführungsformen bei 25°C, pH 7, dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Verbindung mit DMSO als Lösungsmittel.
- 10 Der Unterschied zwischen Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum wird als Stokes-Shift bezeichnet und dieser Wert bestimmt im Wesentlichen, wie gut eine Verbindung für Fluoreszenz-Untersuchungen geeignet ist. Umso größer der Stokes-Shift, desto leichter können Unterschiede zwischen Emission und Exzitation detektiert werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind bevorzugterweise
- 15 durch einen Stokes-Shift >20 nm charakterisiert.
- Besonders bevorzugt sind weiterhin Verbindungen, die eine Halbwertszeit *in vivo* von >60 min besitzen. Hierzu werden in bestimmten Ausführungsformen Verweildauer und Ausscheidungsrate entsprechend markierter Sonden (z.B. ^3H , ^{11}C , ^{18}F)
- 20 bestimmt.
- Die Affinität der fluoreszenten Sonden wird im Regelfall durch die Verdrängung von fluoreszenten oder radioaktiven Referenzliganden indirekt bestimmt. In einer Ausführungsform ist die Affinität der erfindungsgemäßen Liganden durch eine
- 25 Verdrängung von Thioflavin S, Thioflavin T oder ^{11}C -PIB mit einem $\text{EC}_{50} < 300\text{nM}$ charakterisiert. Diese kann z.B. gemessen werden, wie in Lockhart et al., March 4, 2005, The Journal of Biological Chemistry, 280, 7677-7684 unter Material & Methoden beschrieben worden ist, im Speziellen die beiden Absätze „Radioligand Competition Assay“ und „Fluorescence Competition Assay“.
- 30 Bevorzugt sind Verbindungen, die eine erhöhte potentielle Hirngängigkeit bei reduzierter Bindung an weiße Hirnmasse aufweisen sowie eine reduzierte Plasmaprotein-Bindung besitzen.
- 35 Das Diffusionsvermögen einer Verbindung durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich durch seine Fettlöslichkeit (Lipophilie) und Größe bestimmt. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Molmasse <500 g/mol.

Der *log P*-Wert und der *log D*-Wert sind Modellmaße für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Substanz. Die Erwartung ist, mit Hilfe des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten die Verteilungskoeffizienten dieses Stoffes in anderen Systemen mit einer wässrigen und einer lipophilen Phase abschätzen zu können. Der *log P*-Wert ist größer als eins, wenn eine Substanz besser in fettähnlichen Lösungsmitteln wie *n*-Oktanol löslich ist, kleiner als eins wenn sie besser in Wasser löslich ist. Entsprechend ist *log P*-Wert positiv für lipophile und negativ für hydrophile Substanzen. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen *log P*-Wert von 1 bis 2,8 haben. In weiteren Ausführungsformen sind Verbindungen mit einem *log D*-Wert < 5 bevorzugt. Die Messung des *log P*-Werts oder des *log D*-Werts erfolgt über ein Oktanol/Wasser-Zwei-Phasensystem und UV/VIS-Spektroskopie bei 25°C und pH 7. Da nicht für alle Chemikalien der *log P*-Wert und/oder der *log D*-Wert gemessen werden kann, gibt es auch andere Modelle für die Vorhersage, z.B. durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) oder durch Linear Free Energy Relationships (LFER).

Die potentielle Hirngängigkeit der Verbindungen kann auch über die topological polar surface area (TPSA) definiert werden. Diese ist definiert als die Summe der Oberflächenbeiträge der polaren Atome (in der Regel Sauerstoffatome, Stickstoffe und/oder Wasserstoffatome) in einem Molekül. Die Berechnung wurde unter anderem von Ertl, P. et al., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3714-3717 beschrieben. Bevorzugt sind damit insbesondere Verbindungen mit einem TPSA <70 Å².

Ladungsfreiheit bzw. eine schwache Basizität der Verbindungen fördern die gute Penetration durch die Blut-Hirnschranke. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind weiterhin durch eine gute Photostabilität (geringe Photobleichung) und durch eine kurzlebige Singulettanregung gegenüber einer langlebigen Triplettanregung charakterisiert.

In weiteren Ausführungsformen besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine oder mehrere der folgenden physikochemischen Eigenschaften. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, welche mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen:

- a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,

- c) einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

5

Bevorzugt sind weiterhin Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – f):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

Weiterhin bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – g) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – g):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$,
- g) einen log D-Wert < 3 .

30

Ebenso bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften a) und d):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,

- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å².

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen

- 5 Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – i) auf:
 - a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
 - 10 c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - d) EC50 < 300 nM,
 - e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
 - f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å²,
 - g) eine Molmasse < 500 g/mol,
 - 15 h) eine Halbwertszeit *in vivo* von > 60 min,
 - i) einen log D-Wert < 3.

Die hierin offenbarten Verbindungen sind besonders vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Tauopathien.

- 20 Die Gruppe der Tauopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins, eines niedermolekularen Phosphoproteins, welches sich in Zellen an stützende Zytoskelett-Proteine (Mikrotubuli) anlagert und deren Zusammenbau reguliert, im Gehirn ist.

- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin genannten Verbindungen für die frühzeitige Diagnose von Tauopathien genutzt, wie z.B. Morbus Alzheimer, kortikobasale Degeneration, agryophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 (Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17) oder progressive supranukleäre Blickparese.

- 30 Die Verbindungen sind erfindungsgemäß weiterhin vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Synucleinopathien. Die Gruppe der Synucleinopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des α-Synuclein-Proteins im Gehirn ist, wie z.B. Morbus Parkinson. Das α-Synuclein-Protein ist ein Protein von 140 Aminosäuren, das normalerweise nur in den presynaptischen Fortsätzen von Neuronen vorkommt. α-Synuclein ist ein Hauptbestandteil von neuronalen intrazellulären Proteinaggregaten (= Levy-Körperchen), dem charakteristischen neuropathologischen Merkmal der Synucleinopathien.
- 35

Diagnostische Zusammensetzungen, enthaltend mindestens eine Verbindung aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe, werden in einer zum Erreichen einer detektierbaren optischen Antwort in der bildgebenden Diagnostik effektiven Dosis verabreicht. Eine detektierbare optische Antwort ist dadurch charakterisiert, dass eine Änderung oder das Auftreten eines optischen Signals beobachtet oder durch Instrumente gemessen werden kann. In bestimmten Ausführungsformen handelt es sich bei der optischen Antwort um eine Änderung der Fluoreszenz, wie z.B. eine Änderung in der Intensität, Exzitations- oder Emissionswellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder Fluoreszenz-Polarisation.

Die Verbindungen aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinyipyrimidine, 3,6-Divinyipyridazine, 2,5-Divinyipyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe können systemisch oder lokal verabreicht werden. In einer Ausführungsform werden die Verbindungen intravenös verabreicht. In einer anderen Ausführungsform werden die fluoreszenten Sonden parenteral verabreicht. In einer weiteren Ausführungsform werden die Verbindungen enteral verabreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen oral verabreicht. Die Zusammensetzungen mit den erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen enthalten typischerweise eine effektive Konzentration der Verbindungen in einer wässrigen Lösung oder Suspension, welche weiterhin Puffer, Tenside, Thixotropiermittel, Cosolventien, Geschmacksmittel oder dergleichen enthalten kann.

Die hierin genannten Verbindungen sind vorzugsweise in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In weiteren Ausführungsformen können die erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen die Blut-Retina-Schranke überwinden.

Neben dem Gehirn befinden sich die krankheitsursächlichen Proteinablagerungen auch in der Retina.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Verbindungen nach Anlagerung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate in der Retina des Patienten nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mittels Adaption der Lichtfaseroptiken oder der Fluoreszenzmikroskopie.

Die Detektion an der Retina erfolgt in einer Ausführungsform unter Verwendung adaptierter Retinascanner. Hierzu kann z.B. der konfokale Retina-Laserscanner der Firma Heidelberger Engineering benutzt werden (Heidelberg Retina Angiograph 2,

HRA2). Die Detektion kann auch über eine Funduskamera und/oder über einen Laserscanner in Kombination mit Fluoreszenz- (z.B. ICG) und Autofluoreszenztechniken (z.B. Lipofuszin) erfolgen. Alternativ kann die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer („fluorescence lifetime microscopy“, FLIM) und der spektralen Fluoreszenzverteilung zur hochsensitiven Bestimmung der Bindung der erfindungsgemäßen Sonde an das Target verwendet werden. Die gewebeschonende Anregung von Farbstoffen über die Multiphotonen-Mikroskopie bietet weiterhin ein Verfahren mit hoher Eindringtiefe. Als Lichtquellen sind sowohl Laser als auch mit Filtern versehene Lichtquellen geeignet.

Die Detektion erfolgt mittels geeigneter Filtersysteme oder Detektoren, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt ist eine Exzitation im Wellenlängenbereich von 380-900 nm und eine Emission bei 400-1000 nm. Besonders bevorzugt ist die Exzitation zwischen 450-500 nm und die Emission bei 600-650 nm oder 600-700 nm.

In einer weiteren Ausführungsform wird Alzheimer Demenz aufgrund der gesicherten Abwesenheit von Tau-Aggregaten im Darmepithel diagnostiziert. Die Tau-Aggregation im Darmepithel korreliert invers mit der Diagnose Alzheimer Demenz: Der fehlende Nachweis von Tau-Aggregaten mit den offenbarten Verbindungen ist ein sicheres Zeichen für Alzheimer Demenz.

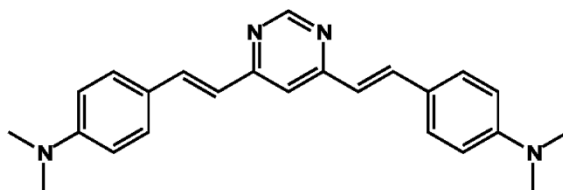
Bevorzugt ist eine Verwendung der Verbindungen der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen.

Über den Nachweis der vorgenannten Aggregate in der Retina ist es erstmals möglich neurodegenerative Erkrankungen nicht-invasiv und ante mortem zu erkennen und damit vorteilhaft einfach und schnell nachzuweisen. Der Einsatz der Verbindungen als fluoreszente Sonden hat den Vorteil, den apparativen Aufwand und damit auch die Kosten erheblich zu senken.

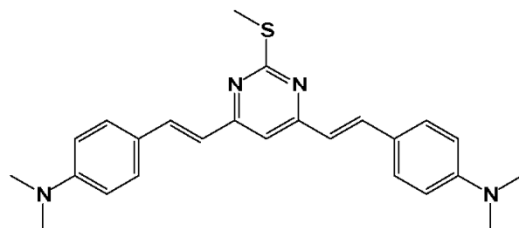
In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Verbindungen um folgende Verbindungen:

4-((1E)-2-(6-(4-(Dimethylamino)styryl)pyrimidin-4-yl)vinyl)-N,N-dimethylbenzylamin

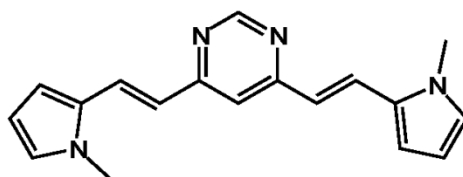
33



5 **4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-(Methylthio)pyrimidin-4,6-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)**

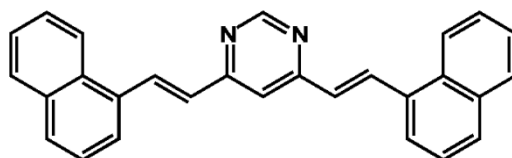


4,6-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrimidin



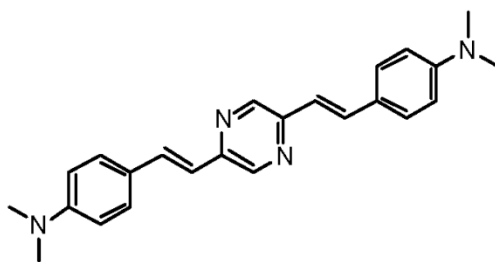
10

4,6-bis((E)-2-(Naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin



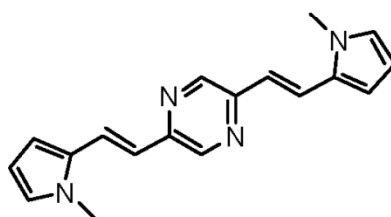
15

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(Pyrazin-2,5-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)



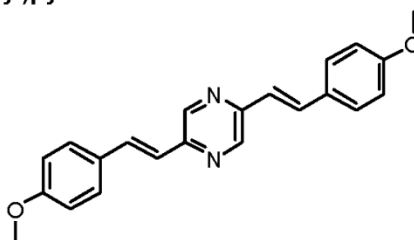
2,5-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazine

5



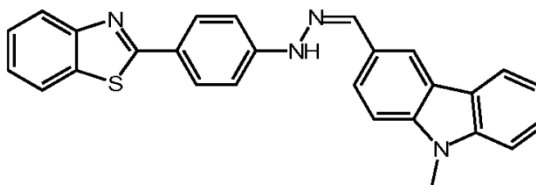
2,5-bis(4-Methoxystyryl)pyrazine

10



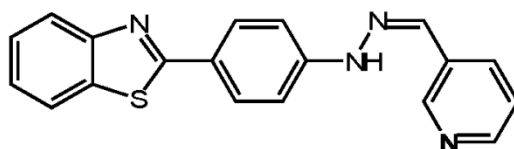
(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((9-methyl-9H-carbazol-3-yl)methylen)hydrazine

15

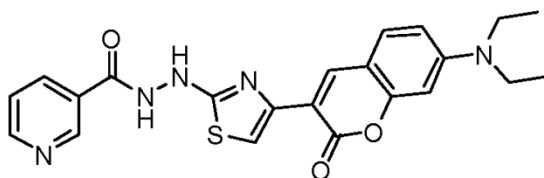


(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((pyridin-3-yl)methylen)hydrazin

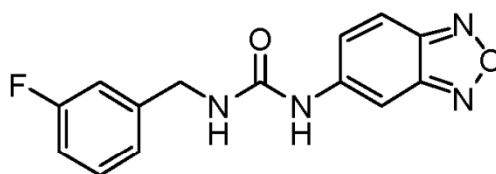
5

***N'*-(4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid**

10

**1-(Benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(3-fluorbenzyl)harnstoff**

15



Zusammenfassung

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen mit hoher Affinität für das
- 5 A β -Protein, α -Synuclein oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hoher
- 10 Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus.

3.1.6. Fluoreszente Sonden für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel

Der Inhalt dieses Kapitels wurde am 29. März 2012 zum internationalen Patent angemeldet.

Internationale Veröffentlichungsnummer: WO2012/037928 A2

Patentanmelder: Klinikum Darmstadt GmbH, Ludwig-Maximilians Universität, Technische Universität Darmstadt

Titel: Compounds for the diagnosis of neurodegenerative disorders on the olfactory epithelium

Erfinder: Boris Schmidt, Daniel Kieser, Roland Heyny-von Haußen, Jochen Herms, Alexander Boländer

Zusammenfassung

In der vorliegenden Erfindung werden Substanzen mit hoher Affinität für die pathologischen Kennzeichen der Alzheimer'schen Krankheit und anderer neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben. Dies bezieht sich auf Aggregate des Proteins A β und des Proteins Tau für die Alzheimer-Demenz und auf das Protein α -Synuclein bei Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Verschiebung, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Die Substanzen sollen für Differentialdiagnosen von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden.

Die Substanzen sollen nach entsprechender Verabreichung in geringer Dosierung eine Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden Pathogene in der Riechschleimhaut erzeugen, genauer in den Bowman-Drüsen der Lamina propria (siehe Kapitel 1.7.1). Das Verfahren ermöglicht dadurch eine fluoreszenzmikroskopische *in vivo* Untersuchung unter Nutzung entsprechender endoskopischer Systeme. Dabei soll eine Verbindung von Frühdiagnose und Vorsorgeuntersuchung auch für große Patientengruppen ermöglicht werden. Dies ist mit den derzeitigen Verfahren wie CT, PET und SPECT nicht möglich.

Die folgenden Seiten enthalten Auszüge aus dieser Patentanmeldung.

Verbindungen für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen am Riechepithel

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen mit Affinität für das A β -Protein, für α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hohe Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung solcher Verbindungen zu Diagnosezwecken sowie ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen.

Die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson bringt für die Patienten erhebliche Vorteile in der Therapie. Allerdings ist die sichere Diagnose des Morbus Alzheimer, insbesondere die der frühen Krankheitsstadien, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch postmortale mikroskopische Untersuchung sicher möglich.

Die aktuellen Methoden am lebenden Alzheimer-Patienten sind heterogen und stützen sich auf Fremdanamnese, bildgebende Verfahren, kognitive Tests und Ausschluss anderer neurodegenerativer Erkrankungen. Die Diagnose am lebenden Patienten, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung, ist oft nicht klar von anderen Demenzen abzugrenzen. Wenn erste Symptome im Kurzzeitgedächtnis auftreten, sind meist bereits erhebliche pathologische Veränderungen im Gehirn erfolgt. Zum Teil können diese Veränderungen mit so genannten nicht invasiven Untersuchungsmethoden erkannt werden, wie z.B. Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) und Positronenemissionstomografie (PET).

WO2009155017 offenbart radiopharmazeutische Zusammensetzungen, die eine hohe Affinität für Amyloid-Plaques besitzen und über Positronenemissionstomografie nachgewiesen werden.

WO2007136996 beschreibt cyanine Farbstoffe, die zur Markierung von Biomolekülen genutzt werden, z.B. für die *in vivo* Diagnose von Krebs.

US20020133019 offenbart Thioflavin-Derivate für die ante mortem *in vivo* Diagnose unter anderem von Alzheimer. Markierte Thioflavine binden dabei an Amyloid-Plaques und werden über Gamma-Imaging, MRT oder NMR-Spektroskopie
5 detektiert.

Keine dieser Methoden und Farbstoffe ist in der Lage, frühe Stadien der Krankheiten zu erkennen und benötigt im Falle der Positronenemissionstomografie eine sehr teure und nicht weit verbreitete Infrastruktur.
10

Die Entnahme von Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) zum Nachweis erhöhter A β -Werte erfordert eine Rückenmarkspunktion. Es stellt damit eine invasive Untersuchungsmethode dar, ist mit einer nicht zu vernachlässigenden Komplikationsrate verbunden und somit insbesondere nicht für
15 Vorsorgeuntersuchungen geeignet.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, geeignete diagnostische Sonden für den Nachweis von neurodegenerativen Erkrankungen bereitzustellen, die über ein optisches Detektionsverfahren am Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius nachgewiesen werden können.
20

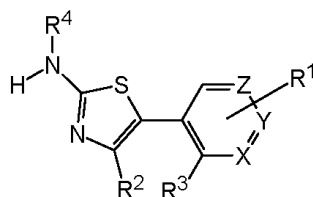
Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch die Verwendung von bestimmten Verbindungen zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung weisen diese Verbindungen
25 mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) auf:

- a) eine > 10fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
- 30 c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
- e) einen $\log P$ -Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

35 Insbesondere weisen Verbindungen der folgenden Stoffklassen drei und mehr der vorgenannten Eigenschaften auf, so dass die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen betrifft, welche eine Affinität zum A β -Protein, α -Synuclein und/oder

Tau-PHF-Aggregaten besitzen und daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind.

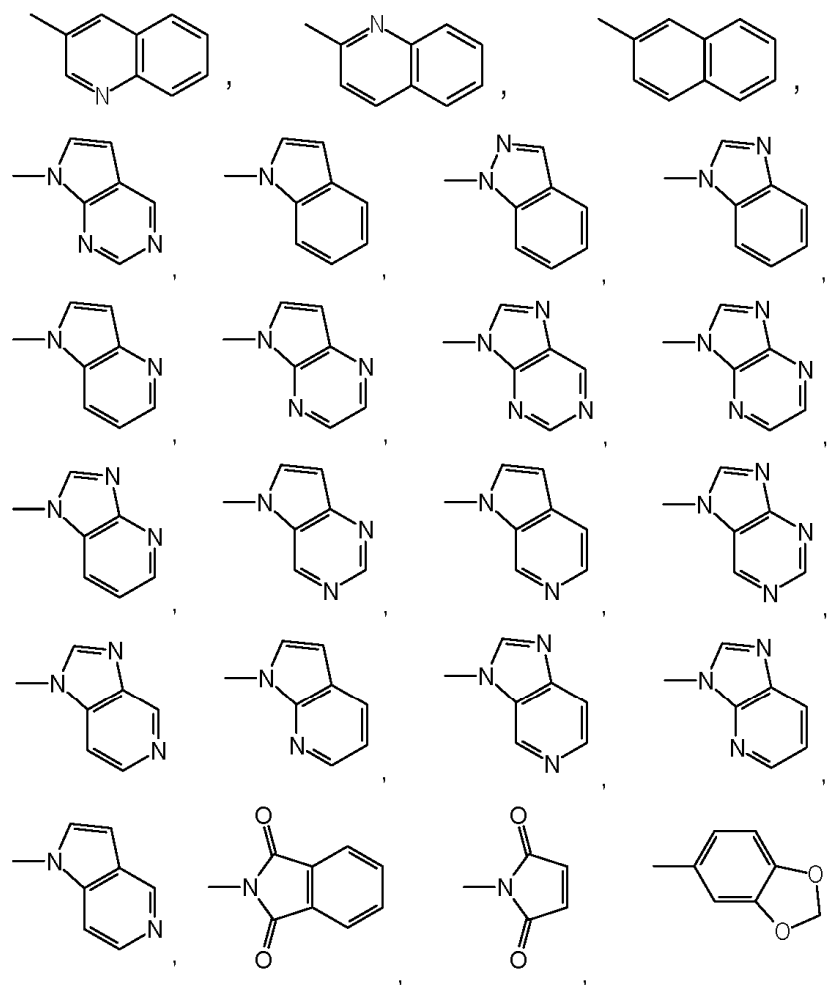
- 5 Verbindungen der Substanzklasse der Arylaminothiazole umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

- 10 R¹, R², R³, R⁴ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl, C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃,
 15 -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl),
 20 -NH(C₂-C₆-Alkenyl), -NH(C₂-C₆-Alkynyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -SO-C₁-C₆-Alkyl, -SO-C₂-C₆-Alkenyl, -SO-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂-C₁-C₆-Alkyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₃H, -SO₃-C₁-C₆-Alkyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO-C₁-C₆-
 25 Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.
- 30 Verbindungen der Substanzklasse der 4,6-Divinylpyrimidine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

X Kohlenstoff oder Stickstoff bedeutet und

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl,

C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-

5 Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl,

C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅,

-OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃,

-NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH,

-COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-

10 Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-

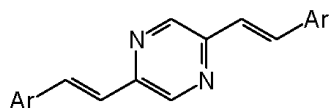
Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl),

-CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CO-

- $N(C_2-C_6\text{-Alkenyl})_2$, $-CO-N(C_2-C_6\text{-Alkynyl})_2$, $-NH(C_1-C_6\text{-Alkyl})$, $-NH(C_2-C_6\text{-Alkenyl})$, $-NH(C_2-C_6\text{-Alkynyl})$, $-N(C_1-C_6\text{-Alkyl})_2$, $-N(C_2-C_6\text{-Alkenyl})_2$, $-N(C_2-C_6\text{-Alkynyl})_2$, $-SO-C_1-C_6\text{-Alkyl}$, $-SO-C_2-C_6\text{-Alkenyl}$, $-SO-C_2-C_6\text{-Alkynyl}$, $-SO_2-C_1-C_6\text{-Alkyl}$, $-SO_2-C_2-C_6\text{-Alkenyl}$, $-SO_2-C_2-C_6\text{-Alkynyl}$, $-SO_3H$, $-SO_3-C_1-C_6\text{-Alkyl}$, $-SO_3-C_2-C_6\text{-Alkenyl}$, $-SO_3-C_2-C_6\text{-Alkynyl}$, $-SO_2NH_2$, $-O-COO-C_1-C_6\text{-Alkyl}$, $-NH-CO-NH_2$, $-NH-CO-NH-C_1-C_6\text{-Alkyl}$, $-NH-CO-N(C_1-C_6\text{-Alkyl})_2$, $-Ph$, $-CH_2-Ph$ oder $-CH=CH-Ph$ sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.

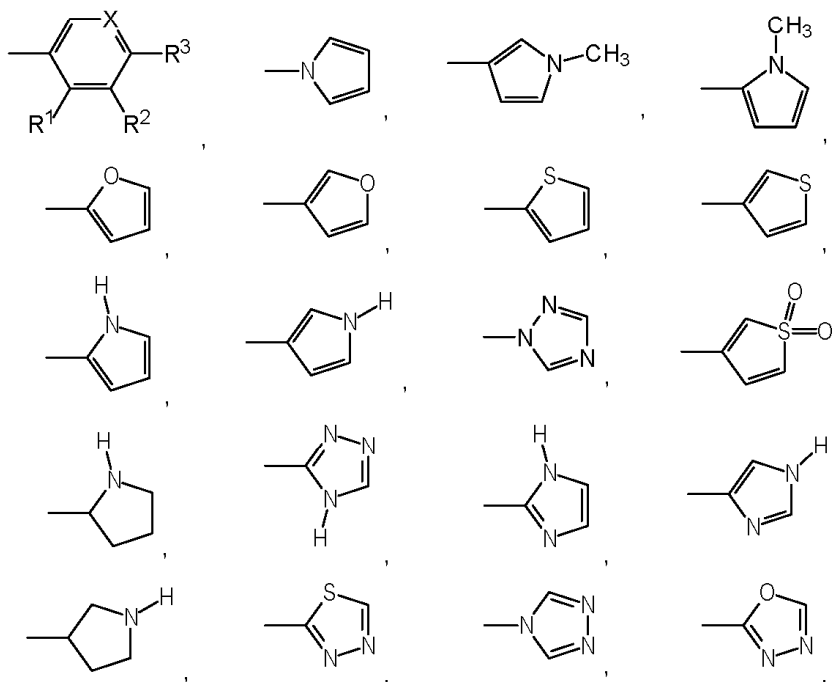
10

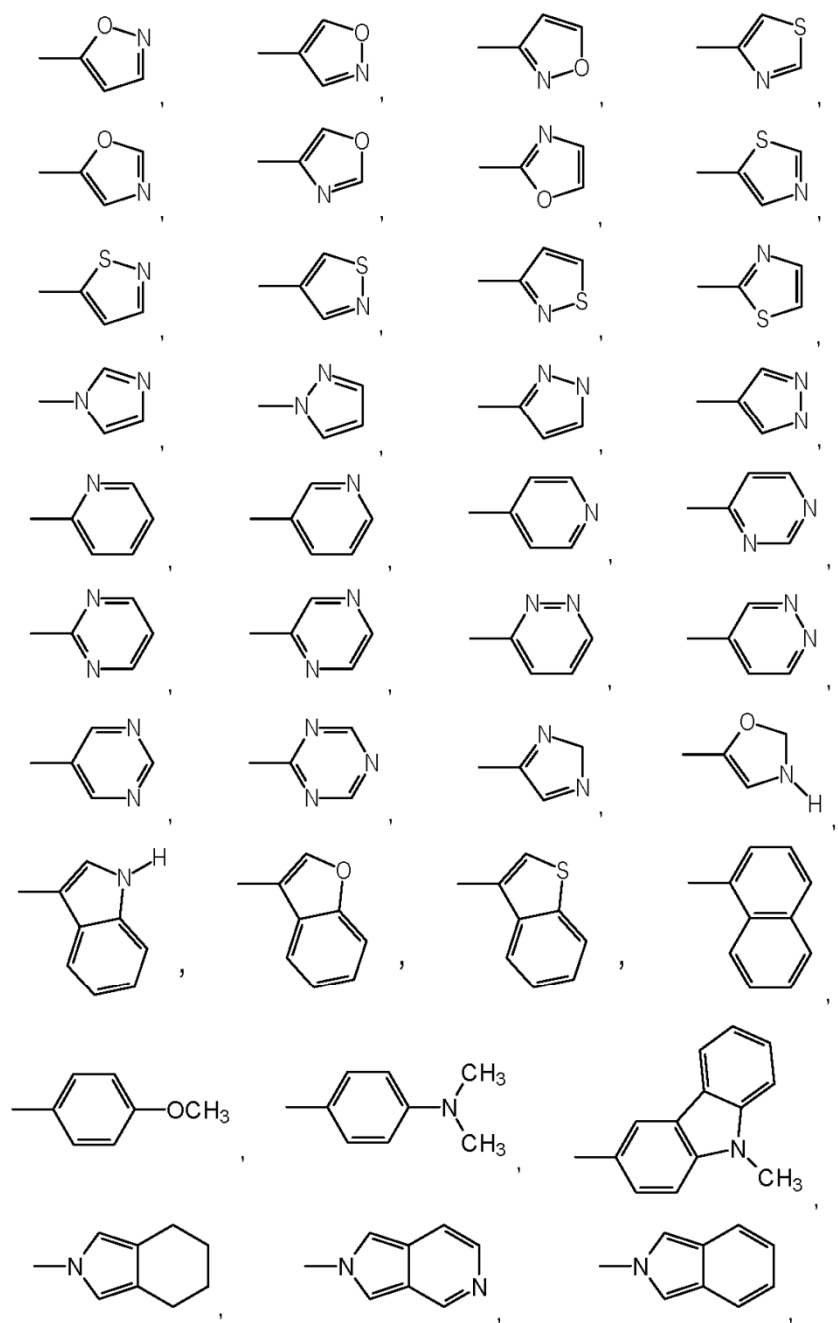
Verbindungen der Substanzklasse der 2,5-Divinylpyrazine umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:

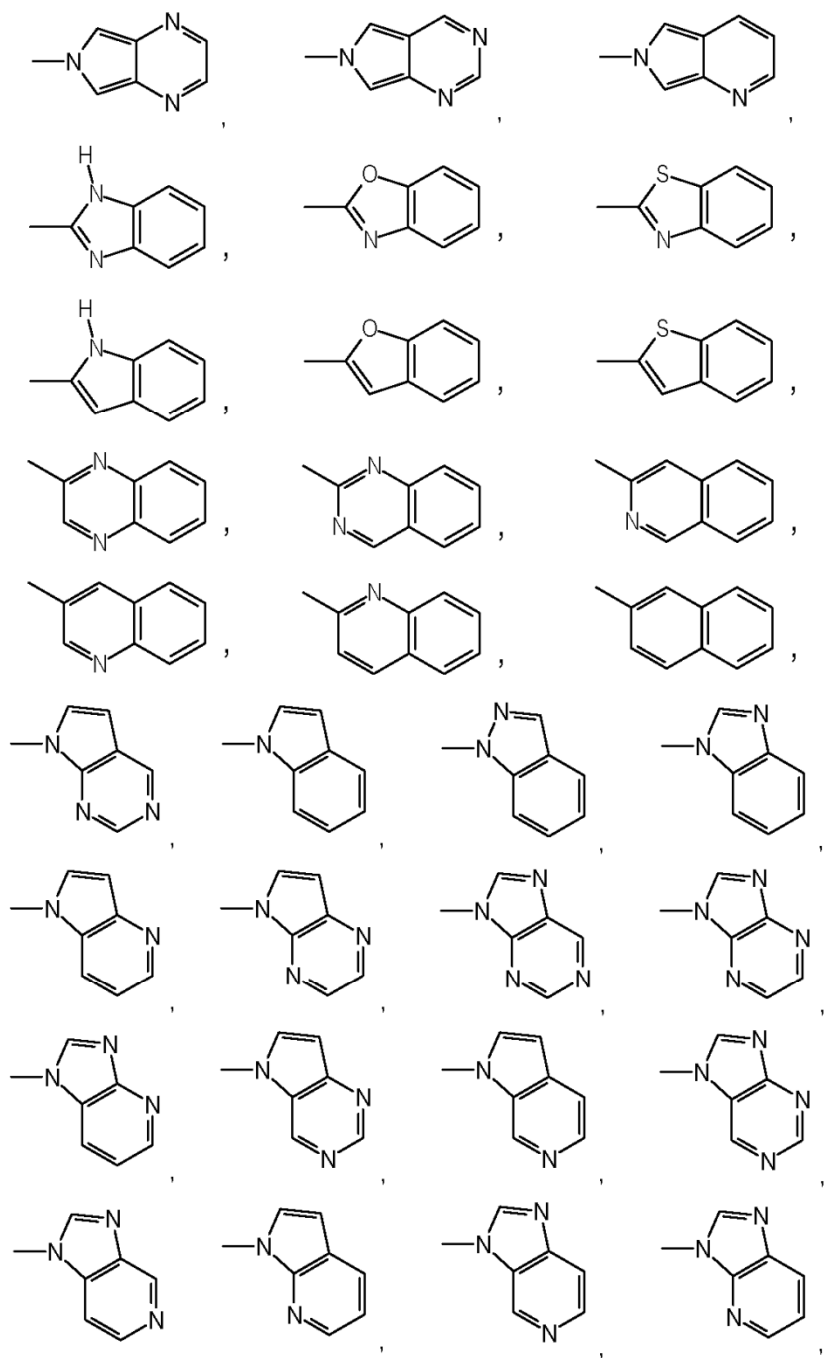


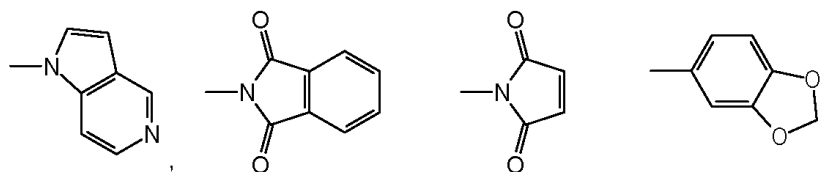
worin

- 15 Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:







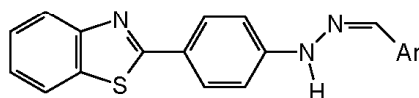


worin

X Kohlenstoff oder Stickstoff bedeutet und

- R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander C_1 - C_6 -Alkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, C_2 - C_6 -Alkynyl, C_4 - C_6 -Alkeninyl, C_3 - C_{10} -Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkanoyl, C_6 - C_{16} -Aryl, C_6 - C_{16} -Heteroaryl, C_1 - C_6 -Haloalkyl, C_2 - C_6 -Haloalkenyl, C_2 - C_6 -Haloalkinyl, C_4 - C_6 -Haloalkeninyl, C_3 - C_{10} -Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃, -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO- C_1 - C_6 -Alkyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -COO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -O-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -O-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -NH-CO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -CO-NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -CO-NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -CO-N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -CO-N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -NH(C_1 - C_6 -Alkyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkenyl), -NH(C_2 - C_6 -Alkynyl), -N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkenyl)₂, -N(C_2 - C_6 -Alkynyl)₂, -SO- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₂- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₃H, -SO₃- C_1 - C_6 -Alkyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkenyl, -SO₃- C_2 - C_6 -Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH- C_1 - C_6 -Alkyl, -NH-CO-N(C_1 - C_6 -Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomeregemische, Diastereomere, Diastereomeregemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen.

Verbindungen der Substanzklasse der [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone umfassen Verbindungen, die vorzugsweise folgende allgemeine Struktur aufweisen:



worin

Ar für einen der folgenden cyclischen, heterocyclischen, aromatischen oder heteroaromatischen Reste steht:

- $-\text{C}(\text{C}_4\text{H}_9)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{C}_3\text{H}_7)=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)=\text{C}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{C}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]=\text{CH}_2$, $-\text{C}[\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)]=\text{CH}_2$, $-\text{C}[\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2]=\text{CH}_2$,
 $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_4-$
 $\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
5 $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-$
 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$
10 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
 $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$
 $\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$,
15 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{C}-$
 CH_3 , $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
20 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}(\text{C}_3\text{H}_7)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})_2$, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$,
 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$,
 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{CH}$,
25 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{C}\equiv\text{CH})_2-\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})_2$, $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$.

Besonders bevorzugt sind Substituenten aus der Gruppe der Phenole, Methylanilin, Dimethylanilin, Methyl-2-aminopyridin, Dimethyl-2-aminopyridin.

30

- Alle erfindungsgemäß eingesetzten und verwendbaren Verbindungen der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder der Diarylharnstoffe verfügen vorzugsweise über mindestens zwei und weiter bevorzugt
 35 über drei aromatische Ringe, welche direkt oder über eine Vinylbrücke oder über eine Harnstoffbrücke miteinander verbunden sind. Besonders bevorzugt sind Verbindungen mit drei aromatischen Ringen, welche über Vinylbrücken miteinander verbunden sind, wodurch sich ausgedehnte π -Elektronensysteme ergeben. Besonders bevorzugt sind Verbindungen der vorgenannten Klassen mit

delokalisierten Elektronen über mindestens 15 beteiligte Atome. Weiter bevorzugt sind Verbindungen mit π -Elektronensystemen, welche sich über mindestens 20 Atome erstrecken und insbesondere bevorzugt sind delokalisierte Elektronensysteme, welche sich über 22 oder mehr Atome erstrecken.

5

Bei den 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen und den 2,5-Divinylpyrazinen sind 22 Atome am π -Elektronensystem beteiligt, wenn Ar für einen 6-Ring steht, und das π -Elektronensystem erstreckt sich über 20 Atome, wenn Ar ein 5-Ring ist.

- 10 Die oben genannten Verbindungen können als fluoreszente Sonden zur Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. Hierbei sind alle Arten von Erkrankungen eingeschlossen, die zu einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen führen. Die Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen basiert sowohl auf der klinischen Präsentation mit topographisch typischer Verteilung und
- 15 involviertem Zelltyp des degenerativen Prozesses als auch auf der Ablagerung von strukturell veränderten Proteinen wie Prion-Protein, Tau, Beta-Amyloid, Alpha-Synuclein, TDP-43 und/oder Huntington. Die Fluoreszenz der erfindungsgemäßen Substanzen wird bei Bindung an die Zielproteine entweder verstärkt oder signifikant verschoben. Dadurch ist erst das notwendige Signal-Rausch-Verhältnis möglich.

20

Der Begriff „Diagnostik oder Diagnose“ umfasst dabei die Bereiche *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* Diagnostik. Generell dient die Diagnostik oder Diagnose ausschließlich oder hauptsächlich dazu, Informationen zu liefern. Diese Informationen geben Aufschluss über:

- 25
- physiologische oder pathologische Zustände oder
 - angeborene Anomalien oder
 - dienen zur Prüfung auf Unbedenklichkeit und/oder Verträglichkeit bei potentiellen Empfängern und/oder
 - zur Überwachung therapeutischer Maßnahmen.

30

Bei der *in vitro* bzw. *ex vivo* Diagnostik werden vom menschlichen Körper stammende Proben verwendet, wie z.B. Blut, Serum, Plasma, Seminalflüssigkeit, Spinalflüssigkeit, peritoneale Flüssigkeit, Speichel, Sputum, Tränenflüssigkeit, Urin, Biopsiematerial oder Gewebespenden. Das Gewinnen einer solchen Probe kann,

35 muss aber nicht, Teil des diagnostischen Verfahrens sein. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das Gewinnen der zur Diagnose vorgesehenen Probe kein Schritt des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens.

Bei der *in vivo* Diagnostik werden die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius nachgewiesen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe werden besonders bevorzugt zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone oder Diarylharnstoffe im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius nachgewiesen.
- 15 Die Erfindung umfasst insbesondere ein Verfahren zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen umfassend,
 - a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und
 20 Diarylharnstoffe; und
 - b) Diagnostizieren der (vermuteten) neurodegenerativen Erkrankung im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius.

- Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur *in vivo* Detektion von A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregaten umfassend,
- 25 a) Verabreichen wenigstens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe; und
 - 30 b) Detektieren der (gebundenen) A β -Proteine, α -Synucleine oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus Olfactorius.

- Die hierin genannten Verbindungen wirken vorzugsweise als fluoreszente Sonden. Sie besitzen eine (vorzugsweise hohe) Affinität für das A β -Protein, α -Synuclein und/oder für Tau-PHF-Aggregate und binden - vorzugsweise spezifisch - an diese.
- 35 Die Bindung der erfindungsgemäßen Verbindungen an eines oder mehrere der oben genannten Zielproteine ist optisch detektierbar. Die Extinktionszunahme bei Bindung an das Zielprotein ist bevorzugt gekennzeichnet durch eine >10x Zunahme der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber der freien

Verbindung und kann experimentell z.B. durch die Verringerung des Hintergrundrauschens bestimmt werden. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ aufweisen. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bzw. der Extinktion erfolgt in bestimmten Ausführungsformen bei 25°C, pH 7, dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Verbindung mit DMSO als Lösungsmittel.

Der Unterschied zwischen Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum wird als Stokes-Shift bezeichnet und dieser Wert bestimmt im Wesentlichen, wie gut eine Verbindung für Fluoreszenz-Untersuchungen geeignet ist. Umso größer der Stokes-Shift, desto leichter können Unterschiede zwischen Emission und Exzitation detektiert werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind bevorzugterweise durch einen Stokes-Shift $> 20 \text{ nm}$ charakterisiert.

Besonders bevorzugt sind weiterhin Verbindungen, die eine Halbwertszeit *in vivo* von $> 60 \text{ min}$ besitzen. Hierzu werden in bestimmten Ausführungsformen Verweildauer und Ausscheidungsrate entsprechend markierter Sonden (z.B. ^3H , ^{11}C , ^{18}F) bestimmt.

Die Affinität der fluoreszenten Sonden wird im Regelfall durch die Verdrängung von fluoreszenten oder radioaktiven Referenzliganden indirekt bestimmt. In einer Ausführungsform ist die Affinität der erfindungsgemäßen Liganden durch eine Verdrängung von Thioflavin S, Thioflavin T oder 11C-PIB mit einem $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$ charakterisiert. Diese kann z.B. gemessen werden, wie in Lockhart et al., March 4, 2005, The Journal of Biological Chemistry, 280, 7677-7684 unter Material & Methoden beschrieben worden ist, im Speziellen die beiden Absätze „Radioligand Competition Assay“ und „Fluorescence Competition Assay“.

Bevorzugt sind Verbindungen, die eine erhöhte potentielle Hirngängigkeit bei reduzierter Bindung an weiße Hirnmasse aufweisen sowie eine reduzierte Plasmaprotein-Bindung besitzen.

Das Diffusionsvermögen einer Verbindung durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich durch seine Fettlöslichkeit (Lipophilie) und Größe bestimmt. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Molmasse $< 500 \text{ g/mol}$.

Der $\log P$ -Wert und der $\log D$ -Wert sind Modellmaße für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Substanz. Die

- Erwartung ist, mit Hilfe des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten die Verteilungskoeffizienten dieses Stoffes in anderen Systemen mit einer wässrigen und einer lipophilen Phase abschätzen zu können. Der *log P*-Wert ist größer als eins, wenn eine Substanz besser in fettähnlichen Lösungsmitteln wie *n*-Oktanol löslich ist, kleiner als eins wenn sie besser in Wasser löslich ist. Entsprechend ist *log P*-Wert positiv für lipophile und negativ für hydrophile Substanzen. Bevorzugt sind Verbindungen, die einen *log P*-Wert von 1 bis 2,8 haben. In weiteren Ausführungsformen sind Verbindungen mit einem *log D*-Wert < 5 bevorzugt. Die Messung des *log P*-Werts oder des *log D*-Werts erfolgt über ein Oktanol/Wasser-Zwei-Phasensystem und UV/VIS-Spektroskopie bei 25°C und pH 7. Da nicht für alle Chemikalien der *log P*-Wert und/oder der *log D*-Wert gemessen werden kann, gibt es auch andere Modelle für die Vorhersage, z.B. durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) oder durch Linear Free Energy Relationships (LFER).
- Die potentielle Hirngängigkeit der Verbindungen kann auch über die topological polar surface area (TPSA) definiert werden. Diese ist definiert als die Summe der Oberflächenbeiträge der polaren Atome (in der Regel Sauerstoffatome, Stickstoffe und/oder Wasserstoffatome) in einem Molekül. Die Berechnung wurde unter anderem von Ertl, P. et al., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3714-3717 beschrieben. Bevorzugt sind damit insbesondere Verbindungen mit einem TPSA <70 Å².
- Ladungsfreiheit bzw. eine schwache Basizität der Verbindungen fördern die gute Penetration durch die Blut-Hirnschranke. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind weiterhin durch eine gute Photostabilität (geringe Photobleichung) und durch eine kurzlebige Singulettanregung gegenüber einer langlebigen Triplettanregung charakterisiert.
- In weiteren Ausführungsformen besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine oder mehrere der folgenden physikochemischen Eigenschaften. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, welche mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen:
- eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das Aβ-Protein, α-Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - einen Stokes-Shift von > 20 nm,
 - einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - EC₅₀ < 300 nM,

- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

Bevorzugt sind weiterhin Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – f):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

Weiterhin bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – g) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften e) – g):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20\text{nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$,
- g) einen log D-Wert < 3 .

Ebenso bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweisen, wobei mindestens eine ausgewählt ist von den Eigenschaften a) und d):

- a) eine > 10 -fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von $> 20 \text{ nm}$,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) $< 70 \text{ \AA}^2$.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – i) auf:

- a) eine > 10-fache Extinktionszunahme bei der Beobachtungswellenlänge nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
- b) einen Stokes-Shift von > 20 nm,
- c) einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$,
- e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
- f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å²,
- g) eine Molmasse < 500 g/mol,
- h) eine Halbwertszeit *in vivo* von > 60 min,
- i) einen log D-Wert < 3.

- Die hierin offenbarten Verbindungen sind besonders vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Tauopathien. Die Gruppe der Tauopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins, eines niedermolekularen Phosphoproteins, welches sich in Zellen an stützende Zytoskelett-Proteine (Mikrotubuli) anlagert und deren Zusammenbau reguliert, im Gehirn ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die hierin genannten Verbindungen für die frühzeitige Diagnose von Tauopathien genutzt, wie z.B. Morbus Alzheimer, kortikobasale Degeneration, agryophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 (Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17) oder progressive supranukleäre Blickparese.

Die Verbindungen sind erfindungsgemäß weiterhin vorteilhaft für die frühzeitige Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen aus der Gruppe der Synucleinopathien. Die Gruppe der Synucleinopathien umfasst neurodegenerative Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal die Ansammlung des α -Synuclein-Proteins im Gehirn ist, wie z.B. Morbus Parkinson. Das α -Synuclein-Protein ist ein Protein von 140 Aminosäuren, das normalerweise nur in den presynaptischen Fortsätzen von Neuronen vorkommt. α -Synuclein ist ein Hauptbestandteil von neuronalen intrazellulären Proteinaggregaten (= Levy-Körperchen), dem charakteristischen neuropathologischen Merkmal der Synucleinopathien.

Diagnostische Zusammensetzungen, enthaltend mindestens eine Verbindung aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-

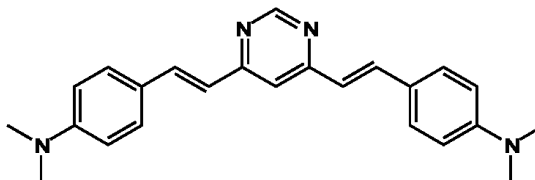
- Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe, werden in einer zum Erreichen einer detektierbaren optischen Antwort in der bildgebenden Diagnostik effektiven Dosis verabreicht. Eine detektierbare optische Antwort ist dadurch charakterisiert, dass eine Änderung oder das Auftreten eines optischen Signals beobachtet oder durch Instrumente gemessen werden kann. In bestimmten Ausführungsformen handelt es sich bei der optischen Antwort um eine Änderung der Fluoreszenz, wie z.B. eine Änderung in der Intensität, Exzitations- oder Emissionswellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder Fluoreszenz-Polarisation.
- 10 Die Verbindungen aus der Gruppe der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und Diarylharnstoffe können systemisch oder lokal verabreicht werden. In einer Ausführungsform werden die Verbindungen intravenös verabreicht. In einer anderen Ausführungsform werden die fluoreszenten Sonden parenteral verabreicht.
- 15 In einer weiteren Ausführungsform werden die Verbindungen enteral verabreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen oral verabreicht. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen topisch nasal verabreicht. Die Zusammensetzungen mit den erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen enthalten typischerweise eine effektive Konzentration der Verbindungen in einer wässrigen Lösung oder Suspension, welche weiterhin Puffer, Tenside, Thixotropiermittel, Cosolventien, Geschmacksmittel oder dergleichen enthalten kann.
- 20 Die hierin genannten Verbindungen sind vorzugsweise in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In weiteren Ausführungsformen können die erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen die Blut-Gewebe-Schranke, die Blut-Leber-Schranke, die Blut-Liquor-Schranke, die Liquor-Hirn-Schranke, die Blut-Nerven-Schranke und/oder die Plazentaschranke überwinden.
- 25 Neben dem Gehirn befinden sich die krankheitsursächlichen Proteinablagerungen auch im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius.
- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Verbindungen nach Anlagerung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder Tau-PHF-Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius des Patienten nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mittels Adaption der Lichtfaseroptiken oder der Fluoreszenzmikroskopie.
- 35

Die Detektion erfolgt mittels geeigneter Filtersysteme oder Detektoren, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt ist eine Exzitation im Wellenlängenbereich von

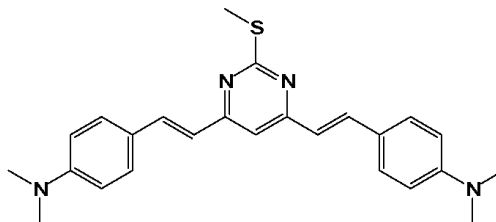
380-900 nm und eine Emission bei 400-1000 nm. Besonders bevorzugt ist die Exzitation zwischen 450-500 nm und die Emission bei 600-650 nm oder 600-700 nm.

- In einer weiteren Ausführungsform wird Alzheimer Demenz aufgrund der gesicherten Abwesenheit von Tau-Aggregaten im Darmepithel diagnostiziert. Die Tau-Aggregation im Darmepithel korreliert invers mit der Diagnose Alzheimer Demenz: Der fehlende Nachweis von Tau-Aggregaten mit den offenbarten Verbindungen ist ein sicheres Zeichen für Alzheimer Demenz.
- 10 Bevorzugt ist eine Verwendung der Verbindungen der Arylaminothiazole, 4,6-Divinylpyrimidine, 3,6-Divinylpyridazine, 2,5-Divinylpyrazine, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazone und/oder Diarylharnstoffe für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen.
- 15 Über den Nachweis der vorgenannten Aggregate im Riechepithel und/oder Bulbus olfactorius ist es erstmals möglich neurodegenerative Erkrankungen nicht-invasiv und ante mortem zu erkennen und damit vorteilhaft einfach und schnell nachzuweisen. Der Einsatz der Verbindungen als fluoreszente Sonden hat den Vorteil, den apparativen Aufwand und damit auch die Kosten erheblich zu senken.
- 20 In besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Verbindungen um folgende Verbindungen:

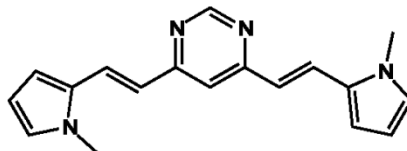
- 25 **4-((1E)-2-(6-(4-(Dimethylamino)styryl)pyrimidin-4-yl)vinyl)-N,N-dimethylbenzylamin**



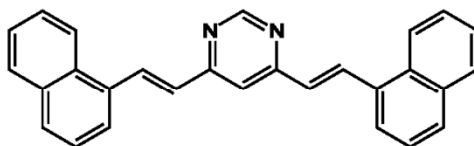
- 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-(Methylthio)pyrimidin-4,6-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylanilin)**



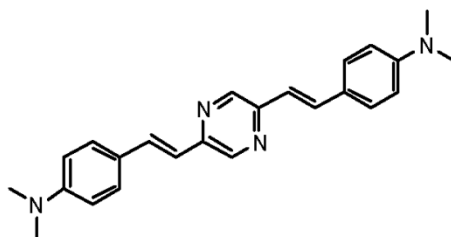
4,6-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrimidin



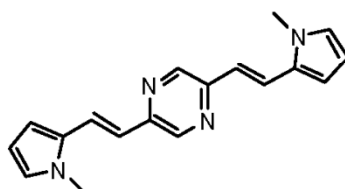
5 **4,6-bis((E)-2-(Naphthalen-1-yl)vinyl)pyrimidin**



10 **4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(Pyrazin-2,5-diyl)bis(ethen-2,1-diyl)bis(*N,N*-dimethylanilin)**

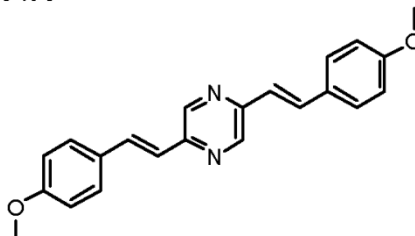


2,5-bis((E)-2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazin

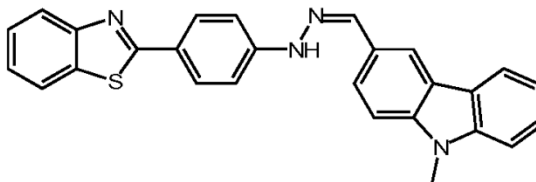


15

2,5-bis(4-Methoxystyryl)pyrazin

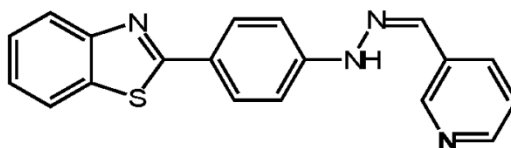


(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((9-methyl-9H-carbazol-3-yl)methylen)-hydrazin



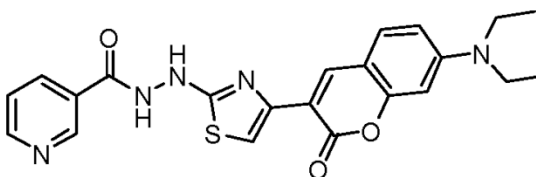
5

(Z)-1-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)-2-((pyridin-3-yl)methylen)hydrazin



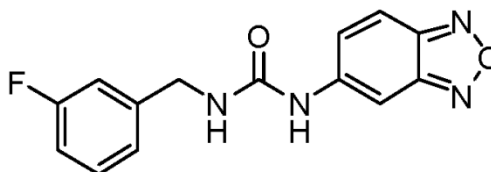
10

N'-(4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiazol-2-yl)nicotinhydrazid



15

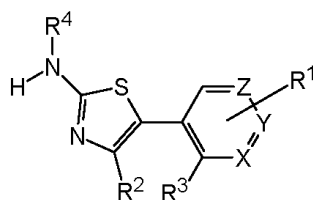
1-(Benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-yl)-3-(3-fluorbenzyl)harnstoff



20

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung einer Verbindung zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, wobei die Verbindung mindestens drei der folgenden Eigenschaften a) – f) aufweist:
 - 10 a) eine > 10-fache Extinktionszunahme nach Bindung an das A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate gegenüber der freien Verbindung,
 - b) einen Stokes-Shift von > 20nm,
 - c) einen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon > 10.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
 - d) $\text{EC}_{50} < 300 \text{ nM}$
 - e) einen log P-Wert von 1 bis 2,8,
 - 15 f) eine topological polar surface area (TPSA) < 70 Å².
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei eine Verbindung von Arylaminothiazolen, 4,6-Divinylpyrimidinen, 3,6-Divinylpyridazinen, 2,5-Divinylpyrazinen, [4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)phenyl]hydrazonen und/oder Diarylharnstoffen zur Diagnose
- 20 von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die neurodegenerative Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe der Tauopathien.
- 25 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 3, wobei die neurodegenerative Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend oder bestehend aus Morbus Alzheimer, kortikobasaler Degeneration, agryophilic grain disease, Morbus Pick, FTDP-17 oder progressiver supranukleärer Blickparese.
- 30 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 4, wobei die Verbindung spezifisch an A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate bindet.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 5, wobei die Verbindung und deren Bindung an ein A β -Protein, α -Synuclein und/oder an Tau-PHF-Aggregate
- 35 mittels Lichtfaseroptik oder Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 6, wobei die Arylaminothiazole folgende allgemeine Struktur besitzen:



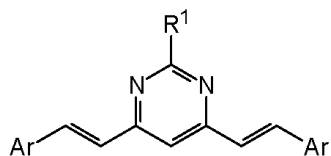
worin

X, Y, Z unabhängig voneinander Kohlenstoff oder Stickstoff bedeuten und

- R¹, R², R³, R⁴ unabhängig voneinander C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₄-C₆-Alkeninyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Thioalkyl, Alkoxy, C₁-C₆-Alkanoyl, C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₆-Heteroaryl, C₁-C₆-Haloalkyl, C₂-C₆-Haloalkenyl, C₂-C₆-Haloalkinyl, C₄-C₆-Haloalkeninyl, C₃-C₁₀-Halocycloalkyl, -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OCF₃, -OC₂F₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -SH, -SCH₃, -SC₂H₅, -COCH₃, -NO₂, -F, -Cl, -Br, -I, -P(O)(OH)₂, -P(O)(OCH₃)₂, -P(O)(OC₂H₅)₂, -COOH, -COO-C₁-C₆-Alkyl, -COO-C₂-C₆-Alkenyl, -COO-C₂-C₆-Alkynyl, -O-CO-C₁-C₆-Alkyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -O-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CONH₂, -NH-CO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-CO-C₂-C₆-Alkynyl, -CO-NH(C₁-C₆-Alkyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkenyl), -CO-NH(C₂-C₆-Alkynyl), -CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -CO-N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl), -NH(C₂-C₆-Alkenyl), -NH(C₂-C₆-Alkynyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(C₂-C₆-Alkynyl)₂, -SO-C₁-C₆-Alkyl, -SO-C₂-C₆-Alkenyl, -SO-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂-C₁-C₆-Alkyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₂-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₃H, -SO₃-C₁-C₆-Alkyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkenyl, -SO₃-C₂-C₆-Alkynyl, -SO₂NH₂, -O-COO-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-NH₂, -NH-CO-NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-CO-N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -Ph, -CH₂-Ph oder -CH=CH-Ph sind; sowie Salze, Enantiomere, Enantiomerengemische, Diastereomere, Diastereomerengemische, Tautomere, Hydrate, Solvate oder Racemate der vorgenannten Verbindungen umfassen.

25

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 – 6, wobei die 4,6-Divinylpyrimidine folgende allgemeine Struktur besitzen:



30

worin

Zusammenfassung

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen mit hoher Affinität für das
- 5 A β -Protein, α -Synuclein oder für Tau-PHF-Aggregate, welche als vorzugsweise fluoreszente Sonden für die *in vivo* Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind, wie z.B. Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson. Die Verbindungen zeichnen sich durch geeignete physikochemische Eigenschaften (Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge, Stokes-Shift, Extinktion) sowie hoher
- 10 Affinität und Selektivität zu den Zielproteinen aus.

3.1.7. Entwicklung einer neuen Präparationsmethode zu Entnahme und histologischer Untersuchung menschlicher Nasenschleimhaut

Der Inhalt dieses Kapitels wurde im November 2011 bei der Fachzeitschrift *Der Präparator, Zeitschrift des Verbandes Deutscher Präparatoren* zur Veröffentlichung eingereicht.

Titel: Präparation der menschlichen Nasenschleimhaut am Institut für Pathologie am Klinikum Darmstadt

Autoren: Loretta Belfiore, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Daniel Kieser, Alexander Boländer und Boris Schmidt.

Zusammenfassung:

In diesem Kapitel wird eine neue Präparationsmethode zur routinemäßigen Entnahme der Schleimhäute der Nasenhöhle vorgestellt. Diese werden dabei im formalinfixierten Zustand vom Knochen der Umgebung gelöst und nach standardisierten Schritten der Gewebsaufarbeitung in Paraffin eingebettet. Diese Methode kommt dabei ohne den Arbeitsschritt der Entkalkung aus, welcher sich oft nachteilig auf das zu untersuchende Gewebe auswirkt.

So konnten nach dieser Methode an Präparaten der Riechschleimhaut von 25 verstorbenen Alzheimer-Patienten histochemische Untersuchungen mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Fluoreszenzmarker durchgeführt werden. Dabei konnten die Bowman-Drüsen der Riechschleimhaut fluoreszenzmikroskopisch als Orte einer Tau-Ablagerung infolge der Alzheimer'schen Krankheit identifiziert werden. Die histochemischen Färbeergebnisse konnten durch immunhistologische Antikörperfärbungen bestätigt werden und stellen die Grundlage einer möglichen endoskopischen *in vivo* Diagnostik dieser Krankheit an der Riechschleimhaut dar.

Beitrag A. Boländer: Histochemische Evaluation der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen **BSc4007**, **BSc4014**, **BSc4083**, **BSc4084**, **BSc4352**, **BSc4353**, **BSc4365**, **BSc4354**, **BSc4364**, **BSc4365**, **BSc4504**, **BSc4505**, **BSc4506**, **BSc4507**, **BSc4508**, **BSc4509**, **BSc4510**, **BSc4511** und **BSc5017** an Präparaten der Riechschleimhaut von Alzheimer-Patienten.

Loretta Belfiore, Dr. Roland Heyny von Haußen, Prof. Gerhard Mall
Dr. Daniel Kieser, Alex Boländer, Prof. Boris Schmidt
Institut für Pathologie, Klinikum Darmstadt GmbH
Clemens-Schöpf-Institut Technische Universität Darmstadt

Präparation der menschlichen Nasenschleimhaut am Institut für Pathologie am Klinikum Darmstadt

Die Nasenhöhle und die Nasennebenhöhlen (insbesondere die Sinus ethmoidales) sollten während jeder Obduktion standardmäßig zumindest inspiziert oder histologisch aufgearbeitet werden, insbesondere wenn Fragestellungen nach einer infektiösen Genese oder den vorderen Schädelbereich befallenden Tumorerkrankung eine Rolle in der Todesursachenfindung spielen.

Die Regio olfactoria der Nasenschleimhaut findet sich im Bereich des vorderen Gesichtsschädels umgeben von einer knöchernen Höhle, deren doppelbogiges Gewölbe das Siebbein von dem Septum nasi in zwei Hälften unterteilt wird. Der Boden ist der knöcherne Gaumen und die Seitenwände werden von den oberen Nasenmuscheln mit medialen Wand- und Dachanteilen der Sinus maxillares und von den medialen Anteilen der Orbitae gebildet. Nach hinten öffnet sich diese Höhle zum Nasenrachen, nach vorne unten in Richtung Nasenausgang.

Die Riechschleimhaut ist somit von einem stabilen knöchernen Gerüst umgeben. Das erschwert seine Präparation. Das Gerüst besteht aus zarten, zum Teil weniger als 1 mm dicken Knochenlamellen, die während eines zu rabiatischen Präparationsprozesses weitgehend zerstört werden können. Die Zuordnung zu den feinatomischen Strukturen kann schwierig werden. Zum anderen stören die knöchernen Anteile der Wände des Cavum nasi die feingewebliche Aufarbeitung, da das Gesamtgebilde aus Knochen, Schleimhaut und Nervenfasern meist auch unter Verwendung von Diamantsägen Schaden nimmt. Zudem schädigt auch der schonendste Entkalkungsprozess gewebeeigene Proteine und/oder Nukleinsäuren unter Umständen in dem Maße, dass bestimmte immunhistologische oder molekularbiologische Untersuchungen erschwert oder unmöglich gemacht werden.

Wir haben deshalb im Rahmen unserer Zusammenarbeit mit dem Clemens-Schöpf-Institut für Biochemie der TU Darmstadt eine Methode für die Präparation der Schleimhäute der Nasenhöhle, insbesondere der Riechschleimhaut entwickelt, bei der diese im formalinfixierten Zustand vom Knochen der Umgebung abpräpariert wird, in dreidimensionaler Rekonstruktion auf die Gewebeprobekörbchen unseres Routinelabors übertragen und nach standardisierter Gewebsaufarbeitung in Paraffin eingebettet als Präparat zur Verfügung steht. Im Rahmen des gemeinsamen Projektes zur Entwicklung spezifischer Markersubstanzen für das TAU-Protein in Alzheimerfibrillen und das Beta-Amyloidprotein in senilen Plaques hatten wir bereits an Gehirngewebe die Möglichkeit des spezifischen Nachweises dieser für die Alzheimererkrankung charakteristischen Eiweißablagerungen durch die vom Clemens-Schöpf-Institut entwickelten und synthetisierten Substanzen zeigen können. Mit Hilfe dieser zum Teil dem Thioflavin (Abb.1) ähnlichen fluoreszierenden Farbstoffen sollte untersucht werden, ob diese in der Lage sind, auch die Ablagerung von TAU-Protein in der Riechschleimhaut der Nase nachzuweisen.

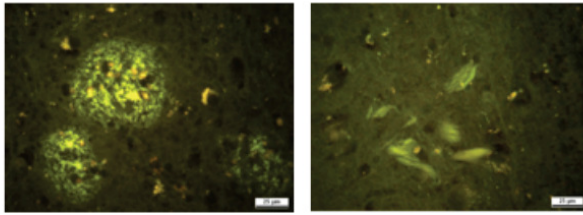
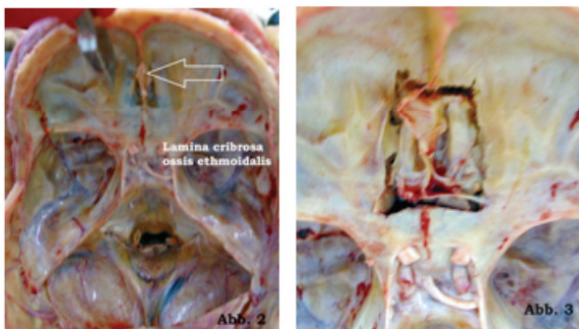


Abb. 1. Plaques (linke Seite) und Alzheimerfibrillen (rechte Seite) in der Thioflavinfluoreszenz.

Ziel war es, eine einfache Methode zu entwickeln, die ohne den Arbeitsschritt der Entkalkung auskommt, und im Histologielabor unseres Institut ohne größeren Aufwand (keine zusätzlichen aufwändigen Handgriffe, keine Großflächenschnitte) zu handhaben ist und eine sichere topographische Zuordnung der anatomischen Strukturen der Nasenhöhle erlaubt.

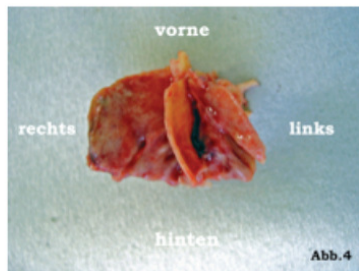
Präparation in situ

Nach Abpräparation der Kopfschwarte wird mit Hilfe einer oszillierenden Säge das Schädeldach zirkulär eröffnet und die Schädelhöhle wird zugänglich. Das Gehirn kann vorsichtig nach Entfernung der Dura mater, dem Absetzen der Hirnnerven, der Eröffnung des Tentoriumschlitzes und der Durchtrennung des oberen Halsmarks entnommen werden. Der Blick ist nun frei auf die Schädelbasis (Abb. 2).



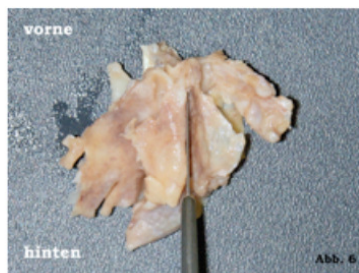
Zentral in der vorderen Schädelgrube ist die Lamina cribrosa des Siebbeins gut zu erkennen. Mit einem T-Meißel und einem Hammer werden in Form eines Rechtecks die Cellulae ethmoidales aufgemeißelt (Abb. 3).

Nun greift man sich mit einer Pinzette Teilstücke der Crista galli (mit anhängenden Stücken der Dura mater) und löst das gesamte Siebbein durch tiefe Inzisionsschnitte mit einem langen schmalen Messer heraus. Hierbei ist zu starke Gewaltanwendung zu vermeiden, um das Präparat nicht zu stark zu beschädigen, damit nach der anschließenden Fixierung in gepuffertem Formalin (pH 6,8–7,2) die anatomische Struktur noch zu erkennen ist. Abb. 4 zeigt nun das entnommene Präparat von der Nasenhöhle aus mit dem Septum nasi und der im Gewölbe des Septum nasi rechts und links gelegenen Anteilen der Regio olfactoria.

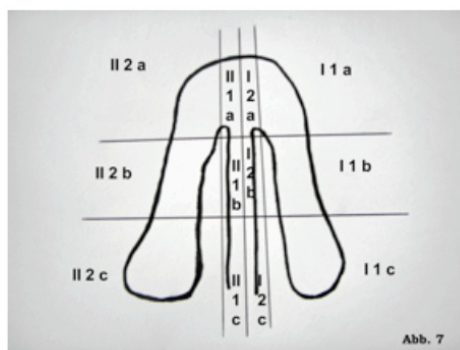


Nach ausreichender Fixierung (7 Tage) beginnt die Feinpräparation der Schleimhaut. Das Vorgehen der Feinpräparation wurde ebenfalls standardisiert und alle Gewebeprobe in der gleichen Ausrichtung (von vorne, hinten, rechts und links Abb.4) präpariert. Als Hilfe kann man sich hierzu an der Crista Galli (evtl. Dura mater) und den Conchae nasales orientieren.

Nun wird mit einem Skalpell oder einer Coronarschere das Präparat in drei Teile geteilt, wobei die Seitenwände vom Septum nasi am höchsten Punkt des Nasendoms unter Durchtrennung des Siebbeins abgetrennt werden, da aufgrund des spitzen Winkels des Nasendoms eine Präparation der Schleimhaut in diesem Bereich nicht möglich ist, ohne die Schleimhaut zu stark zu beschädigen. (Abb.6).

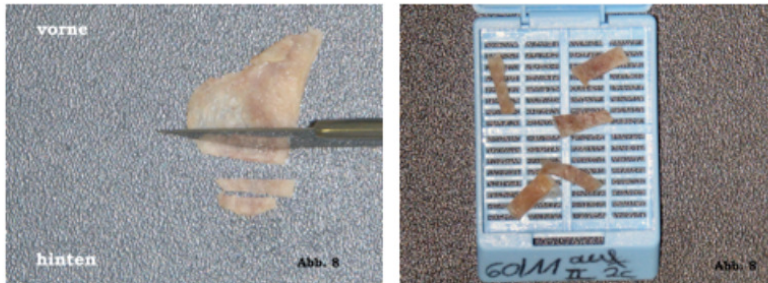


Das von uns entwickelte standardisierte Präparierschema (Abb.7) teilt die Nasenhöhle in mehrere Sektoren ein, die von vorne nach hinten präpariert werden.



Mit einem Skalpell beginnt man die Schleimhaut von den knöchernen und knorpeligen Anteilen vorsichtig abzupräparieren. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Schleimhaut in einem Stück bleibt und

nicht beschädigt wird. Ausreichend scharfe Skalpellklingen, die bei Abstumpfung sofort gewechselt werden müssen, sind hierfür erforderlich. Die abpräparierte Schleimhaut wird dann mit dem Skalpell in sagittaler Richtung in 2-3 mm breite Streifen unterteilt, in die Histologieförmchen überführt und in gepuffertem Formalin (pH 6,8–7,2) erneut fixiert (Abb.8).



Beim Ausbetten werden diese auf die Schnittkante „aufgestellt“ und können dann mit dem Mikrotom geschnitten werden.

Vierundzwanzig Nasenschleimhäute wurden orientierend auf diese Weise standardisiert aufgearbeitet. Entsprechend dem Sektorschema von Abb. 7 sind die Anteile der Riechschleimhaut immer im Sektor I1a, I2a, II1a oder II2a zu finden (Abb.9).

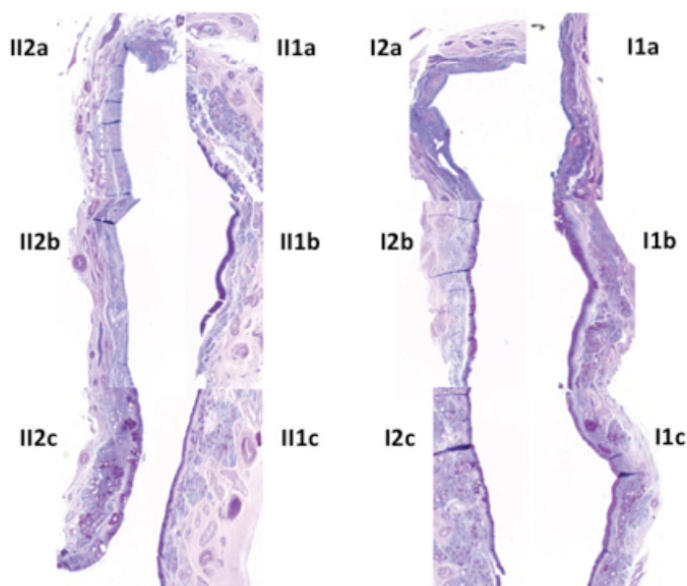


Abb. 9. Sektorschema angeordnete Bilder der Nasenschleimhaut eines 55-jährigen Mannes (PAS-Färbung). PAS-negatives Riechepithel findet sich in den Sektoren I1a, I2a, II1a und II2b.

Der Vorteil dieser Präparation liegt vor allem darin, dass Zusatzuntersuchungen (Immunhistologie, Molekularpathologie, Histochemie, Spezialfärbungen) nicht den Artefakten einer Entkalkung unterworfen

sind. Beispiele für immunhistologische Untersuchungen zeigen Abb. 10 und von Farbstoff BSC4090 des Clemens Schöpf-Instituts Abb. 11.

Die immunhistologischen Färbungen wurden mit dem Ventana Benchmark XT Automated Stainer (Ventana, Tuscon, AZ) mit den Antikörpern in Tabelle 1 und dem Ventana UltraView DAB Kit (Ventana, Tuscon, 41 AZ) durchgeführt.

Antigen	Clon	Verdünnung
NSE	BBS/NC/VI-H14 (Dako)	1:200
TAU	polyclonal Ab-3 (Neomarker)	1:500

Tabelle 1. Exemplarische immunhistologische Färbungen an der Riechschleimhaut.

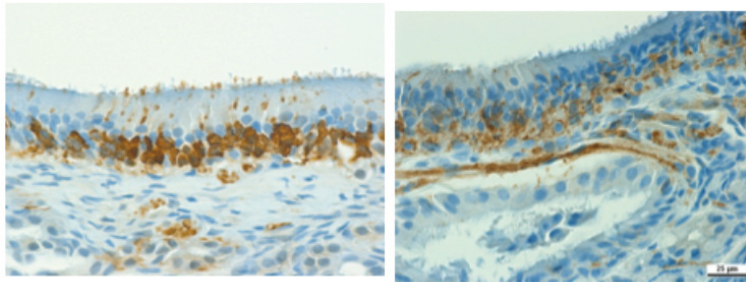


Abb.10. Immunhistologische Färbungen für NSE (linke Seite) und TAU (rechte Seite) im Riechepithel der Riechschleimhaut.

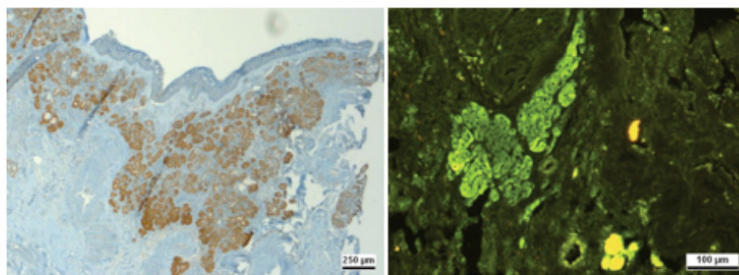


Abb. 11. Immunhistologie für TAU sowie Fluoreszenzfärbung mit BSC4090 in Bowman-Drüsen der Riechschleimhaut.

3.1.8. Synthese von Inhibitoren der Glykogen-Synthetase-Kinase 3 β

Der Inhalt dieses Kapitels wurde im Juni 2011 bei der Fachzeitschrift *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* zur Veröffentlichung angenommen.

Titel: Synthesis and biological evaluation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: A fast and atom efficient access to 1-aryl-3-benzylureas

Autoren: Fabio LoMonte, Thomas Kramer, Alexander Boländer, Batya Plotkin, Hagit Eldar-Finkelman, Ana Fuertes, Juan Dominguez und Boris Schmidt.

Zusammenfassung:

In diesem Kapitel wird die Synthese von Inhibitoren des Enzyms GSK-3 β vorgestellt, das mit einer Hyperphosphorylierung des Proteins Tau im Rahmen der Alzheimer'schen Krankheit diskutiert wird (siehe Abschnitt 1.1.3). Die synthetisierten Inhibitoren leiten sich strukturell von dem GSK-3-Inhibitor AR-A014418 der Firma AstraZeneca, einem Thiazolylharnstoff-Derivat ab.

Die hier vorgestellten Harnstoffe wurden durch die Reaktion benzyliischer Amine mit Isocyanaten bzw. über Suzuki-Kupplungsreaktionen erhalten. Bei der *in vitro* Evaluation ihrer inhibitorischen Wirkung auf GSK-3 β konnten zwei Substanzen identifiziert werden, die eine zwei- bzw. dreifach höhere Aktivität aufwiesen, als der Referenzinhibitor AR-A014418. Die Toxizität der Produkte wurde in einem Zebrafisch-Embryo-Phänotyp-Assay untersucht. Dabei wurde deutlich, dass AR-A014418 phänotypische Veränderungen der Fischembryos auslöst und damit als toxisch anzusehen ist. Einige der hier synthetisierten Inhibitoren, welche nicht die Thiazolyleinheit von AR-A014418 tragen, haben sich als deutlich weniger toxisch erwiesen.

Beitrag A. Boländer: Synthese von **53**, **55**, **56**



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and biological evaluation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: An fast and atom efficient access to 1-aryl-3-benzylureas

Fabio Lo Monte^{a,†}, Thomas Kramer^{a,†}, Alexander Boländer^a, Batya Plotkin^b, Hagit Eldar-Finkelman^b, Ana Fuentres^c, Juan Dominguez^c, Boris Schmidt^{a,*}

^a Clemens Schöpf–Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

^b Department of Human Molecular Genetics and Biochemistry, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel

^c Noscira, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2011

Revised 11 June 2011

Accepted 13 June 2011

Available online 18 July 2011

Keywords:

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)

Alzheimer disease

Structure–activity relationship (SAR)

Suzuki coupling

Microwave irradiation

ABSTRACT

The glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is implicated in multiple cellular processes and has been linked to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). In the course of our research topic we synthesized a library of potent GSK-3 inhibitors. We utilized the urea scaffold present in the potent and highly selective GSK-3 inhibitor AR-A014418 (AstraZeneca). This moiety suits both (a) a convergent approach utilizing readily accessible building blocks and (b) a divergent approach based on a microwave heating assisted Suzuki coupling. We established a chromatography-free purification method to generate products with sufficient purity for the biological assays. The structure–activity relationship of the library provided the rationale for the synthesis of the benzothiazolylurea **66** (IC₅₀ = 140 nM) and the pyridylurea **62** (IC₅₀ = 98 nM), which displayed two to threefold enhanced activity versus the reference compound **18** (AR-A014418: IC₅₀ = 330 nM) in our assays.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder defined by progressive memory loss and cognitive impairment.¹ The definite diagnosis of AD is possible postmortem only. It is based on the presence of extracellular plaques of β -amyloid (A β), and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) consisting of hyperphosphorylated tau protein.² Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) interacts with several neuronal proteins that are directly linked to AD.³ There are two GSK-3 genes, GSK-3 α and GSK-3 β . Both are ubiquitously expressed and constitutively active proline-directed serine/threonine kinases.¹ Several GSK-3 inhibitors have been studied in kinase assays and cellular test panels. Among these inhibitors are paullones, indirubin, aminomaleimides and other small molecules. The potent and specific GSK-3 inhibitor AR-A014418 (**18**) was reported by AstraZeneca and its interactions with the essential amino acids of GSK-3 β are denoted in Figure 1.⁴

AR-A014418 (**18**) is selective against Cdk2, Cdk5 and 26 other kinases tested. It inhibits GSK-3 activity with a strongly assay dependent IC₅₀, the highest activity was reported as IC₅₀ = 104 nM.⁴ AR-A014418 constitutes a lead compound in our kinase inhibitor programme targeting neurodegenerative diseases.⁵

There is a need of a robust and inexpensive approach to AR-A014418 (**18**), suitable for combinatorial chemistry, which

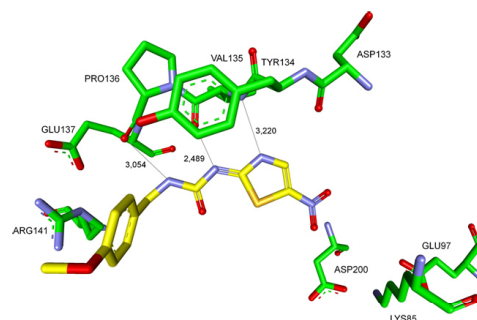


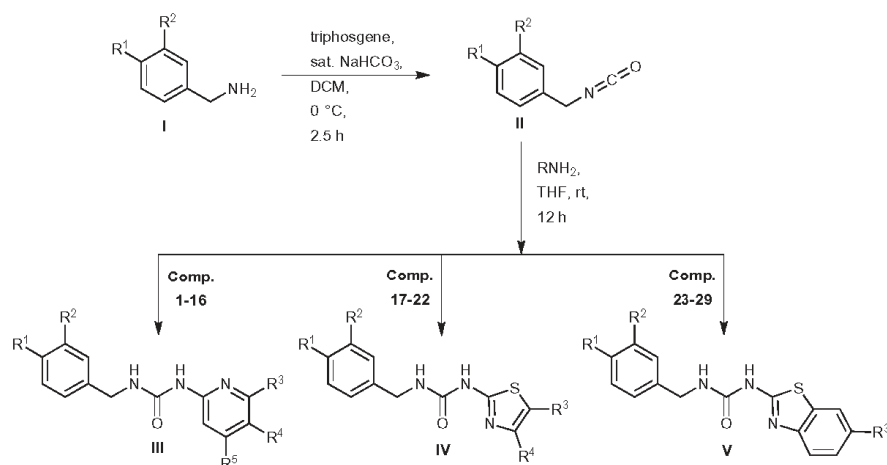
Figure 1. Potent and highly selective GSK-3 inhibitor AR-A014418 (AstraZeneca) in the ATP binding pocket of GSK-3 β ; important protein–inhibitor interactions are shown. The distance is denoted in Å. PDB code 1Q5K (Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5).

provides straightforward access to related ureas displaying enhanced GSK-3 inhibition. The generation of chemical diversity and the limitation by commercial building blocks stimulated a search for mild reaction conditions, rapid purification strategy and access to the reactive intermediate isocyanates without distillation.⁶ The two step protocol utilized the in situ generation of

* Corresponding author. Tel.: +49 6151 164531; fax: +49 6151 163278.

E-mail address: schmidt_boris@t-online.de (B. Schmidt).

[†] These authors contributed equally to this work.



Scheme 1. Mild synthesis and rapidly purified ureas.

Table 1
Mild synthesis provides crystalline ureas free of chromatography

Compd	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Yield ^a (%)	c Log P ^c
1	F	H	H	H	H	11	3.74
2	F	H	Br	H	H	52	3.48
3	MeO	H	Br	H	H	41	3.25
4	F	H	H	Br	H	54	3.48
5	MeO	H	H	Br	H	48	3.25
6	MeO	H	H	H	Br	75	3.25
7	F	H	H	H	Cl	31	3.33
8	MeO	H	H	H	Cl	34	3.10
9	MeO	H	H	H	CN	63 ^b	2.00
10	F	H	H	NO ₂	H	21 ^b	2.51
11	MeO	H	H	NO ₂	H	13 ^b	2.28
12	F	H	H	CN	H	63 ^b	2.22
13	MeO	H	H	CN	H	58 ^b	2.00
14	Br	H	H	CN	H	34 ^b	2.94
15	OCF ₃	H	H	CN	H	13 ^b	3.10
16	–OCH ₂ O–	H	CN	H	H	19 ^b	2.04
17	F	H	NO ₂	H	–	21 ^b	2.34
18	MeO	H	NO ₂	H	–	26 ^b	2.11
19	F	H	COOEt	Me	–	35 ^b	3.02
20	MeO	H	COOEt	Me	–	24 ^b	2.80
21	F	H	H	4-Me-Ph	–	29 ^b	5.00
22	MeO	H	H	4-Me-Ph	–	46 ^b	4.77
23	F	H	Br	–	–	24 ^b	4.87
24	MeO	H	F	–	–	52 ^b	3.92
25	F	H	CF ₃	–	–	31 ^b	4.96
26	MeO	H	CF ₃	–	–	50 ^b	4.74
27	MeO	H	NO ₂	–	–	26 ^b	3.64
28	F	F	NO ₂	–	–	36 ^b	3.93
29	MeO	H	CN	–	–	70 ^b	3.34

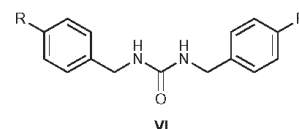
^a Yields of analytically pure products; products recrystallized from methanol or ethanol.

^b Amines preactivated with *n*-BuLi.

^c Determined by CS ChemOffice 2008.

isocyanates from benzylamine and triphosgene. These crude intermediates were dissolved in dry *N,N*-dimethylformamide or dry tetrahydrofuran and reacted with nonactivated or *n*-butyllithium (*n*-BuLi) activated amines (Scheme 1 and Table 1).

Initially, the reaction of aminopyridines was dominated by the dimerization of benzylamines. This resulted in the isolation of known benzylamine adducts **30** and **31** (Scheme 2 and Table 2).^{7,8}



Scheme 2. Commonly observed dimerization product.

Table 2
Dimerization derived products

Compd	R	Yield ^a (%)	c Log P ^b
30 ^{a,7}	4-F	37	3.17
31 ⁶	4-MeO	43	2.72

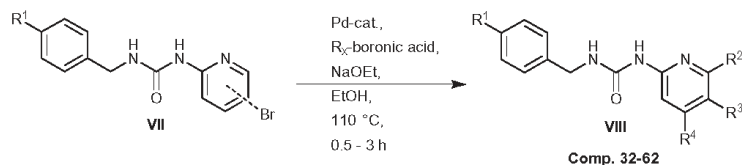
^a Yields of analytically pure products; products recrystallized from methanol.

^b Determined by CS ChemOffice 2008.

Using *n*-BuLi for the deprotonation of the heterocyclic amines solved this problem. Furthermore, high-pressure liquid chromatography (HPLC) controls showed that the *n*-BuLi preactivated amines reacted with the isocyanates immediately, but nevertheless the reactions were stirred 12 h at room temperature. Afterward the reaction solution was suspended in vigorously stirred water and precipitation occurred promptly. The purification of the crude urea was achieved by filtration and recrystallization. These reaction and purification conditions were standardized for a variety of amines, including benzylamines, aminopyridines and aminothiazoles.

AR-A014418 (**18**) was synthesized without heating and chromatographic purification, which were employed by AstraZeneca 2003.⁴ The initial yields of the standard methodology were moderate at best, but they did not require chromatography and the yield of compound **6** obtained by the standard protocol was optimized in scaled up experiments to 75%. Thus the atom efficiency of the total process, which includes the purification, is actually sufficiently high as it produces very little waste material.

The required diversity was introduced by the Suzuki-coupling of arylbromides and boronic acids (Scheme 3 and Table 3).



Scheme 3. Suzuki reactions.

Table 3
Urea enlargement supported by Suzuki reaction

Compd	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Yield ^a (%)	c Log P ^d
32	F	Ph	H	H	40 ^b	4.58
33	MeO	Ph	H	H	71 ^b	4.36
34	F	3-F-Ph	H	H	29 ^b	4.75
35	F	3-MeO-Ph	H	H	31 ^b	6.37
36	MeO	3-MeO-Ph	H	H	34 ^b	6.13
37	F	3-BnO-Ph	H	H	51 ^b	6.37
38	F	4-Py	H	H	67 ^b	3.26
39	MeO	4-Py	H	H	50 ^b	3.04
40	F	H	Ph	H	70 ^c	4.37
41	MeO	H	Ph	H	47 ^c	4.15
42	F	H	4-Me-Ph	H	34 ^c	4.87
43	MeO	H	4-Me-Ph	H	32 ^c	4.65
43	MeO	H	4-Me-Ph	H	32 ^c	4.65
44	F	H	3-F-Ph	H	68 ^c	4.54
45	MeO	H	3-F-Ph	H	33 ^c	4.32
46	F	H	3-MeO-Ph	H	37 ^c	4.39
47	MeO	H	3-MeO-Ph	H	34 ^c	4.17
48	F	H	3-Isopro-poxy-Ph	H	43 ^c	5.23
49	MeO	H	3-Isopro-poxy-Ph	H	61 ^c	5.01
50	F	H	3-BnO-Ph	H	26 ^c	6.16
51	MeO	H	3-BnO-Ph	H	19 ^c	5.94
52	MeO	H	3-CF ₃ -Ph	H	27 ^c	5.07
53	F	H	2,3-di-F-Ph	H	83 ^c	4.62
54	MeO	H	2,3-di-F-Ph	H	26 ^c	4.40
55	F	H	4-Vinyl-Ph	H	85 ^c	5.09
56	MeO	H	4-Vinyl-Ph	H	87 ^c	4.87
57	MeO	H	H	Ph	77 ^b	4.15
58	MeO	H	H	3-F-Ph	57 ^b	4.32
59	MeO	H	H	3-MeO-Ph	62 ^b	4.17
60	MeO	H	H	2-MeO-Ph	47 ^c	3.61
61	MeO	H	H	2-Thio-phen	33 ^c	4.06
62	MeO	H	H	2-F-Py	67	3.03

^a Yields of analytically pure products; products were recrystallized from methanol.^b Pd(OAc)₂.^c Pd(PPh₃)₄.^d Determined by CS ChemOffice 2008.

The Suzuki coupling of phenylboronic acids and brominated arylureas was catalyzed by Pd(OAc)₂ under standard conditions or subtle modifications thereof.^{9,10} Some reactions required catalyst exchange to Pd(PPh₃)₄. The boronic acids were activated by sodium ethanolate. The starting materials were suspended in dry ethanol and the reactions were carried out in a sealed, argon flushed vessel. Again, the crude products of the Suzuki reaction were purified by atom efficient recrystallization.

Finally, we obtained four tetrazole derivatives (**63–66**) using microwave radiation in a Biotage Initiator 300. These products were purified by recrystallization and isolated in very good yields requiring no further optimization at this stage (Scheme 4 and Table 4), although the reaction conditions can be improved by using ionic liquids.¹¹ Be careful while working with azides, they can be explosive and should be handled with great care. During our study we encountered no adverse events.¹²

The arylureas were evaluated for their inhibition of GSK-3 activity. Several compounds were identified to reduce in vitro GSK-3β activity beneath 50% at a concentration of 10 μM (Table 5).¹³

Two derivatives (**66** and **62**) are more potent than our reference compound AR-A014418 (**18**). Five derivatives (**29**, **63**, **11**, **60**, and **13**) display comparable inhibitory activity and four of them are not associated with toxicity alerts (Fig. 2). It should be noted that the tetrazoles, for example, compound **63** with a topological polar surface area of 111.83 Å² (ChemOffice2008) may not permeate the blood brain barrier.

A docking study of compound **66** and PDB structure 1Q5K of GSK-3β suggested a binding mode along the hinge region of the ATP-binding pocket approximately like AR-A014418 (**18**) (Fig. 3).^{4,14} There are two hydrogen bond interactions between **66** and the amino acid Glu137. Furthermore we assume two other interactions, one between the Asp133 carbonyl and a hydrogen of the phenyl group and the other between the tetrazol moiety and the polar pocket consisting of Lys85, Glu97 and Asp200. We hypothesize that the latter interaction is the reason for the enhanced potency of derivative (**66**).

Via the expeditious structure–activity relationship (SAR) we ascertained that the aminothiazole, used by AstraZeneca, can be

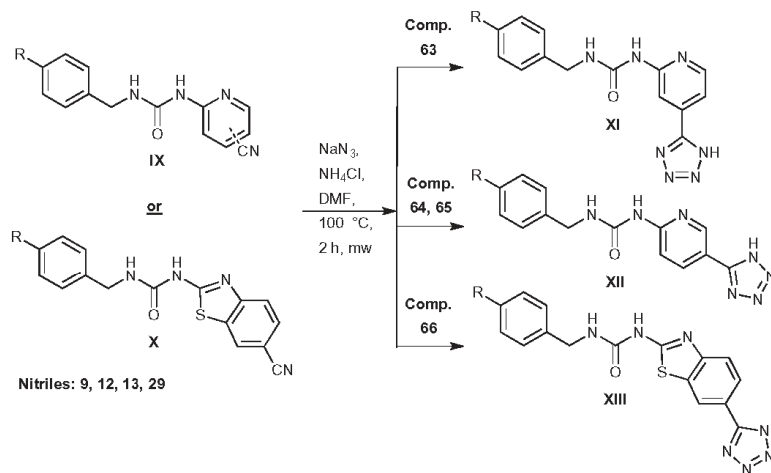


Table 4
Urea aryl tetrazole formation by microwave reaction

Compd	R	Yield ^a (%)	c Log P ^b
63	MeO	87	1.75
64	F	81	1.98
65	MeO	88	1.75
66	MeO	91	3.26

^a Yields of analytically pure products; products recrystallized from methanol.

^b Determined by CS ChemOffice 2008.

replaced by aminopyridines and aminobenzothiazoles. We found that an elongation in position R³ and R⁴ of structure **III** entailed reduced activity. However, an acceptor like NO₂ or CN is needed in

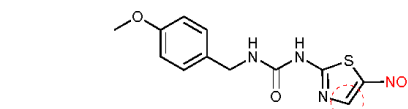


Figure 2. Potential toxic alerts: 1. Nitro group; 2. P450 associated-hepatotoxicity alert.

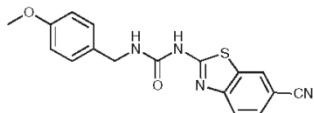
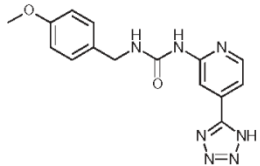
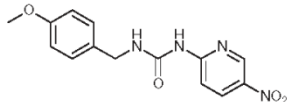
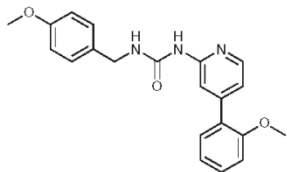
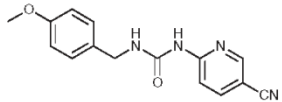
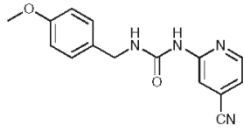
position R⁴ of structure **III** as long as no acceptor is allocated in position R⁵. Our future research is focused on structure **V** and position R⁵ of structure **III** from which we expect to obtain improved activity.

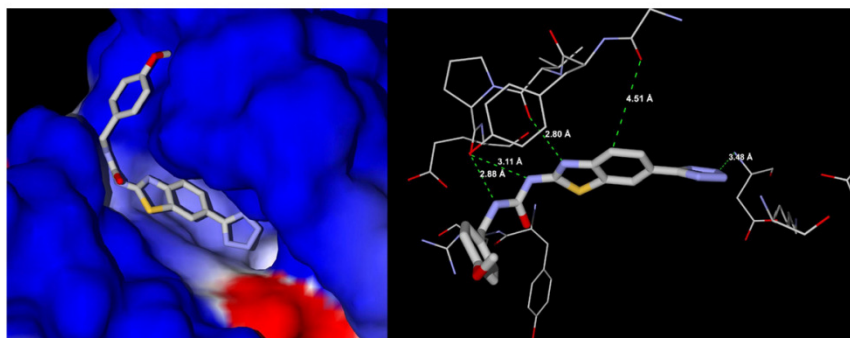
Table 5
GSK-3β inhibitory activity of selected compounds

Compd	Structure	GSK-3β activity in ^a (%)	
		1 μM of compd	10 μM of compd
62		—	12
66		69	18
18		55	20

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Compd	Structure	GSK-3 β activity in ^a (%)	
		1 μ M of compd	10 μ M of compd
29		57	24
63		82	24
11		75	31
60		91	32
13		79	40
9		101	42

^a Conditions for GSK-3 β in vitro assay see Supplementary data.¹⁰**Figure 3.** Docking of compound **66** into PDB structure 1Q5K of GSK-3 β ; Surface illustration of the ATP-binding pocket with **66** (left); Hydrogen bond interactions of **66** with the amino acids of the ATP-binding pocket (right).^{4,14}

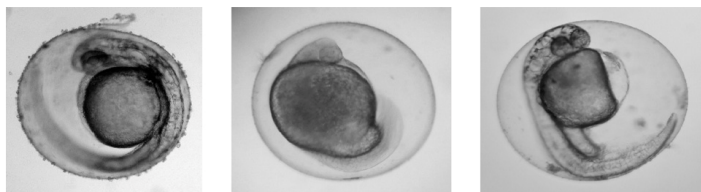


Figure 4. Exposure of zebrafish embryos to 1% DMSO (left), 100 mM **18** (AR-A014418, middle), and 100 mM **66** (right). The embryos were collected and maintained in E2 medium at 30 °C, compounds were added at 8–15 somites, and the phenotypes were compared after 25 h.

Table 6
GSK3 selectivity panel

Compound	IC ₅₀ values (nM)					
	GSK-3β	GSK-3α	Cdk5/p35	CKIε	AurKA	PKCα
18 (AR-A014418)	0.33	0.07	>100	>100	>100	>100
9	1.43	1.12	>100	>100	>100	>100
27	3.64	0.22	>100	>100	>100	>100
63	0.51	0.37	>100	>100	>100	>100
66	0.14	0.13	26.4	15.3	4.8	24.2

To evaluate the specificity of the family against GSK-3β, four of the synthesized compounds (**9**, **27**, **63** and **66**) were selected and tested against five human protein kinases (GSK-3α, PKCα, AurKA, Cdk5/p35 and CKIε) (Table 6).

Compound **66** with an IC₅₀ of 140 nM for GSK3β was the only one able to inhibit all of the kinases tested (PKCα, AurKA, Cdk5/p35 and CKIε) but the IC₅₀ values were one or two orders of magnitude above those found for the GSK-3 isoforms, indicating a fair degree of selectivity for this compound towards these latter enzymes. Such selectivity is even larger for the other three compounds tested, which were inactive (or poorly active) against the former kinases when tested up to 100 μM.

In order to demonstrate the utility and nontoxicity of the pyridine and benzothiazole moiety in whole organisms, we performed a zebrafish embryo phenotype assay.^{15,16} We exposed the zebrafish embryos to the compounds **66**, **18** (AR-A014418) and **63** at early stages of development (8 till 15 somites, Fig. 4).

Controls after 18 h and 25 h showed that **18** (AR-A014418) is indeed toxic. This toxicity could be diminished by replacement of the thiazole with a benzothiazole (**66**) or pyridine (**63**) moiety (CHIR98014 is not toxic and compound **19** precipitates—data not shown). We observed some deformation in the fishtail at 100 μM (**66**, **63** and at 25 μM of CHIR98014—data not shown) and after eclosion we observed these fishes were swimming in circles only. This correlates with the observation that Wnt signaling, and thus GSK-3β, plays a crucial role in the development of metazoan and that known GSK-3 inhibitors like LiCl and the ruthenium complex (**R**)-7 perturb the zebrafish development.¹⁵

We have established a fast and atom efficient approach to generate kinase targeting urea derivatives. Hereby, it is feasible to diversify the scaffold in a time efficient manner. Thereby we expect to identify novel GSK-3 inhibitors displaying enhanced activity and

selectivity. A preview of the biological activity and selectivity of the synthesized compounds is depicted in Tables 5 and 6. They are of comparable potency and selectivity to the reference compound **18** (AR-A014418). The aminothiazole used by AstraZeneca was replaced by other heterocycles. We have also shown that a selection of our compounds compared to **18** (AR-A014418) were less toxic in a zebrafish embryo phenotype assay, albeit some of these are not expected to be brain penetrant. This is subject of ongoing and future research in animal models of Alzheimer's disease.

Acknowledgment

This work was supported by a collaborative project financed by the 7th Framework Program of the European Union.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2011.06.131.

References and notes

- Hooper, C.; Killick, R.; Lovestone, S. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1433.
- Bhat, R. V.; Haeblerlein, S. L. B.; Avila, J. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 1313.
- Eldar-Finkelman, H. *Trends in Mol. Med.* **2002**, *8*, 126.
- Bhat, R.; Xue, Y.; Berg, S.; Hellberg, S.; Ormø, M.; Nilsson, Y.; Radesäter, A.; Jerning, E.; Markgren, P.; Borgegard, T.; Nylöf, M.; Giménez-Cassina, A.; Hernández, F.; Lucas, J.; Díaz-Nido, J.; Avila, J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45937.
- Hoettecke, N.; Liebeck, M.; Baumann, K.; Schubert, R.; Winkler, E.; Steiner, H.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2958.
- Tsai, J. H.; Takaoka, L. R.; Powell, N. A.; Nowick, J. S. *Org. Synth.* **2002**, *78*, 220.
- Wiley, R.; Beasley, P.; Knabeschuh, L. J. *Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 311.
- Shelton, P.; Zhang, Y.; Nguyen, T.; McElwee-White, L. *Chem. Commun.* **2009**, 947.
- Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
- Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, *48*, 9633.
- Schmidt, B.; Meid, D.; Kieser, D. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 492.
- (a) Prudent Practice for Handling Hazardous Chemicals in Laboratories, National Academic: Washington, DC, 1983, 87; (b) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320.
- Liberman, Z.; Eldar-Finkelman, H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4422.
- Molegro Virtual Docker, Version 4.2.0 (October 4th, 2010).
- Atilla-Gökçumen, G. E.; Williams, D. S.; Bregman, H.; Pagano, N.; Meggers, E. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1443.
- Paquet, D.; Bath, R.; Sydow, A.; Mandelkow, E.; Berg, S.; Hellberg, S.; Färling, J.; Distel, M.; Köster, R.; Schmid, B.; Haass, C. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1382.

Supporting Information

Synthesis and biological evaluation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: a fast and atom efficient access to 1-aryl-3-benzylureas

Fabio Lo Monte^{*a}, Thomas Kramer^{*a}, Alexander Boländer^a, Batya Plotkin^b, Hagit Eldar-Finkelman^b,
Ana Fuertes^c, Juan M. Dominguez^c and Boris Schmidt^{†a}

^a Clemens Schöpf - Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,
Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Hessen,
Germany, Fax: +496151-163278; Tel: +496151-161531;

^b Department of Human Molecular Genetics and Biochemistry, Sackler School of Medicine,
Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel.

^c Noscira S. A. Tres Cantos 28760, Madrid, Spain

† E-mail: schmidt_boris@t-online.de

*These authors contributed equally to this work.

Content:

<u>General procedure</u>	<u>2</u>
<u>Chemical Data</u>	<u>3</u>
<u>GSK-3β <i>in vitro</i> assay</u>	<u>36</u>
<u>Kinase panel</u>	<u>36</u>

General procedure

1.) Synthesis of the urea derivatives

The amine (0.80 mmol) was added to a stirred mixture of 5 ml saturated sodium bicarbonate solution (NaHCO_3) and 5 ml dichloromethane (DCM) at 0 °C. Afterwards triphosgene (0.28 mmol) was added slowly. After 2.5 h at 0 °C 10 ml of DCM were added and the organic layer separated from the aqueous phase. The aqueous phase was washed twice with 10 ml of DCM. The combined organic layers were washed with ammonium chloride (NH_4Cl) and brine and later dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to approximately 0.5 ml.

To the residue was added dry tetrahydrofuran (THF, 1.5 ml). It was added dropwise to a solution of *n*-butyllithium (0.80 mmol, 1.6 M in *n*-Hexane) deprotonated amine (0.80 mmol) in 1.5 ml tetrahydrofuran and stirred at room temperature overnight. The reaction solution was added to a vigorous stirred water to give the solid crude urea. The solid was filtered off and recrystallised from methanol or ethanol.

2.) Suzuki coupling

An urea derivative with a bromo substituent (0.15 mmol), boronic acid (0.19 mmol), sodium ethoxide (0.31 mmol) and 1 mol-% of palladium acetate or 1 mol-% of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) were suspended in 1 ml dry ethanol and stirred for 0.5 - 3 h at 110 °C. Afterwards the solution was filtered and the solvent evaporated. The residue was added to water and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and the solvent was evaporated. The solid was recrystallised from ethanol or methanol.

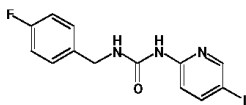
3.) Microwave synthesis

Entry **9**, **12**, **13** or **29** (0.10 mmol), sodium azide (NaN_3 , 1.20 mmol) and ammonium chloride (NH_4Cl , 1.20 mmol) were added to 1 ml of *N,N*-dimethylformamide (DMF) and stirred for 2 h at 100 °C under microwave irradiation. After cooling to room temperature the reaction solution was added to water, acidified with 2 N HCl and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and the solvent evaporated off to provide the product.

Chemical Data

The ^1H -NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 spectrometer at 300 MHz and Bruker AC 500 spectrometer at 500 MHz. The ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 spectrometer at 75 MHz and Bruker AC 500 spectrometer at 125 MHz. Chemical shifts are reported as ppm downfield from Me_4Si . Mass spectrometry was performed on a Bruker-Franzen Esquire LC mass spectrometer and a MAT 95 double focussing sector field MS. Microwave experiments were carried out using a Biotage[®] Initiator[™] microwave apparatus. All microwave experiments were carried out in sealed microwave process vials utilizing the standard absorbance level (300 W maximum power). High performance liquid chromatographies were carried out on an Agilent 1100 (column: reversed phase, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm; 254 nm). Melting points were recorded on a SMP 10 Bibby Stuart Scientific apparatus.

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-iodopyridin-2-yl)urea (1)



^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 4.35 (2H, d, J = 6.0 Hz), 6.91 (2H, m), 7.17 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.28 (2H, m), 7.85 (1H, dd, J = 8.8, J = 2.4); 8.24 (1H, dd, J = 2.2 Hz, J = 0.6 Hz), 8.48 (1H, s), 8.64 (1H, s)

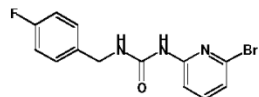
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ [ppm] = 43.7, 82.3, 115.4, 116.1, 116.3, 130.5, 130.6, 137.5, 137.6, 147.3, 153.7, 154.3, 156.0, 162.2, 164.1

EI-MS: m/z 371 (M^+)

Melting Point: 169-171 $^\circ\text{C}$

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(6-bromopyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (2)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.34 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.16 (3H, m), 7.35 (2H, m), 7.40 (1H, m), 7.62 (1H, m), 7.70 (1H, d, J = 8.2 Hz), 9.56 (1H, s)

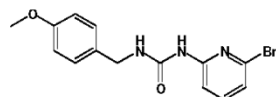
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.2, 110.8, 115.4, 115.5, 120.8, 129.4, 136.2, 138.5, 141.4, 153.8, 154.5

EI-MS: m/z 323 (M⁺)

Melting Point: 170 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(6-bromopyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (3)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.39 (3H, s), 4.34 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.96 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.20 (1H, dd, J = 7.6 Hz, J = 0.6 Hz), 7.29 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.38 (1H, t, J = 5.7 Hz), 7.68 (1H, m), 7.76 (1H, dd, J = 8.2 Hz, J = 0.5 Hz), 9.51 (1H, s)

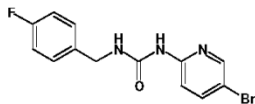
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.6, 56.5, 111.7, 115.3, 121.7, 129.9, 132.9, 139.6, 142.5, 155.0, 155.5, 159.7

EI-MS: m/z 335 (M⁺)

Melting Point: 158 °C

HPLC-Retention Time: 6.2 min

1-(5-bromopyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (4)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.42 (2H, d, J = 5.8 Hz), 7.22 (2H, m), 7.40 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.59 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.95 (1H, dd, J = 8.9 Hz, J = 2.5 Hz), 8.05 (1H, s), 8.35 (1H, d, J = 2.5 Hz), 9.44 (1H, s)

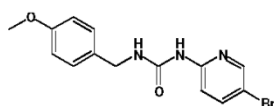
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.2, 111.0, 113.8, 115.4, 129.5, 136.3, 140.9, 147.7, 152.2, 154.4, 154.8

EI-MS: m/z 323 (M⁺)

Melting Point: 178-180 °C

HPLC-Retention Time: 6.6 min

1-(5-bromopyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (5)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.37 (3H, s), 4.43 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.22 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.54 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.88 (1H, dd, J = 8.9 Hz, J = 2.5 Hz), 7.91 (1H, s), 8.27 (1H, d, J = 2.2 Hz), 9.32 (1H, s)

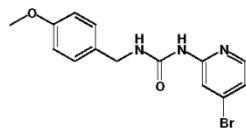
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.2, 55.5, 111.2, 113.7, 114.1, 128.8, 132.0, 140.8, 147.8, 152.5, 154.7, 158.6

EI-MS: m/z 335 (M⁺)

Melting Point: 148-150 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(4-bromopyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (6)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.30 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.17 (1H, dd, J = 5.4 Hz, J = 1.8 Hz), 7.23 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.79 (1H, d, J = 1.6 Hz), 8.00 (1H, s), 8.07 (1H, d, J = 5.5 Hz), 9.36 (1H, s)

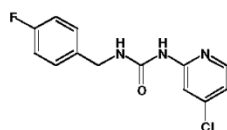
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.0, 54.8, 113.6, 113.7, 119.6, 128.3, 131.4, 132.8, 148.3, 154.1, 154.2, 158.1

EI-MS: *m/z* 335 (*M*⁺)

Melting Point: 176 °C

HPLC-Retention Time: 5.3 min

1-(4-chloropyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (7)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.36 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.05 (1H, dd, J = 5.5 Hz, J = 1.9 Hz), 7.15 (2H, m), 7.35 (2H, m), 7.62 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.11 (1H, s), 8.16 (1H, d, J = 5.7 Hz), 9.44 (1H, s)

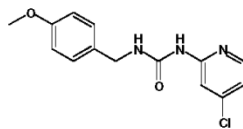
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.3, 111.2, 115.4, 117.4, 129.4, 136.4, 144.2, 149.0, 154.9, 160.5, 162.5

EI-MS: *m/z* 279 (*M*⁺)

Melting Point: 195-197 °C

HPLC-Retention Time: 5.2 min

1-(4-chloropyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (8)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.97 (3H, s), 4.54 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.12 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.29 (1H, dd, J = 5.5 Hz, J = 1.9 Hz), 7.47 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.87 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.23 (1H, s), 8.40 (1H, d, J = 5.7 Hz), 9.62 (1H, s)

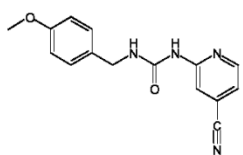
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 40.7, 53.6, 109.2, 112.3, 115.6, 127.0, 130.1, 142.3, 147.2, 152.9, 153.0, 156.8

EI-MS: m/z 291 (M⁺)

Melting Point: 186-188 °C

HPLC-Retention Time: 4.9 min

1-(4-cyanopyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (9)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.72 (3H, s), 4.29 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.89 (2H, m), 7.23 (2H, m), 7.34 (1H, dd, J = 1.3 Hz, J = 5.1 Hz), 7.73 (1H, t, J = 5.6 Hz), 7.94 (1H, s), 8.41 (1H, dd, J = 0.6 Hz, J = 5.1 Hz), 9.55 (1H, s)

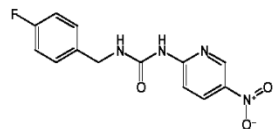
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.1, 55.0, 113.4, 113.8, 116.9, 118.0, 120.7, 128.5, 131.4, 149.0, 153.7, 154.2, 158.3

EI-MS: m/z 282 (M⁺)

HRMS: calcd. for C₁₅H₁₄N₄O₂ 282.1117, found 282.1099.

HPLC-Retention Time: 6.06 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-nitropyridin-2-yl)urea (10)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.38 (2H, m), 6.96 (2H, m), 7.30 (2H, m), 7.56 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.35 (2H, m), 8.90 (1H, s), 9.24 (1H, s)

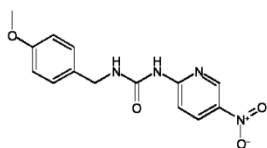
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.9, 112.6, 116.2, 116.4, 130.6, 134.8, 137.1, 140.3, 145.5, 155.2, 158.8

EI-MS: *m/z* 291 (*M*⁺)

Melting Point: 207-209 °C

HPLC-Retention Time: 6.3 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-nitropyridin-2-yl)urea (11)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.32 (2H, d, J = 5.6 Hz), 6.76 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.18 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.59 (1H, d, J = 9.2 Hz), 8.19 (1H, s), 8.34 (1H, dd, J = 9.2 Hz, J = 2.4 Hz), 8.90 (1H, d, J = 2.2 Hz), 9.15 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 44.1, 55.9, 112.5, 115.1, 130.0, 132.8, 134.7, 140.2, 145.5, 155.1, 158.9, 160.3

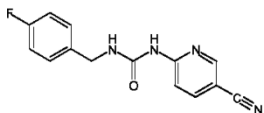
EI-MS: *m/z* 302 (*M*⁺)

HRMS: calcd. for C₁₄H₁₄N₄O₄ 302.1015, found 302.0972.

Melting Point: 189-191 °C

HPLC-Retention Time: 6.1 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-cyanopyridin-2-yl)urea (12)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.43 (2H, d, J = 5.6 Hz), 7.21 (2H, m), 7.41 (2H, m), 7.75 (1H, d, J = 8.8 Hz), 8.11 (1H, m), 8.16 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 2.2 Hz), 8.69 (1H, m), 9.84 (1H, m)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.4, 101.3, 111.7, 114.2, 115.4, 115.6, 117.9, 128.7, 129.4, 129.5, 136.1, 136.1, 141.6, 152.1, 154.4, 156.0, 160.6, 162.5

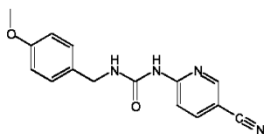
EI-MS: m/z 270 (M⁺)

HRMS: calcd. for C₁₄H₁₁N₄OF 270.0918, found 270.0897.

Melting Point: 221-222 °C

HPLC-Retention Time: 5.7 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-cyanopyridin-2-yl)urea (13)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.79 (3H, s), 4.37 (2H, d, J = 5.0 Hz), 6.96 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.29 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.76 (1H, d, J = 8.9 Hz), 8.00 (1H, s), 8.15 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 2.3 Hz), 8.69 (1H, dd, J = 2.2 Hz, J = 0.6 Hz), 9.79 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.0, 54.8, 100.7, 111.1, 113.6, 117.3, 128.3, 131.1, 141.0, 151.6, 153.7, 155.5, 158.1

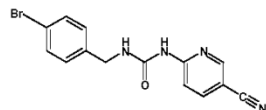
EI-MS: m/z 282 (M⁺)

HRMS: calcd. for C₁₅H₁₄N₄O₂ 282.1117, found 282.1104.

Melting Point: 198-201 °C

HPLC-Retention Time: 5.7 min

1-(4-bromobenzyl)-3-(5-cyanopyridin-2-yl)urea (14)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.43 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.34 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.60 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.75 (1H, d, J = 8.9 Hz), 8.15 (1H, d, J = 5.7 Hz), 8.18 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 2.3 Hz), 8.72 (1H, d, J = 2.2 Hz), 9.89 (1H, s)

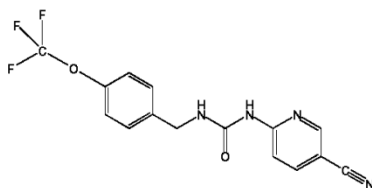
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.4, 101.2, 111.6, 117.7, 120.1, 129.4, 129.6, 131.3, 131.5, 139.4, 141.5, 152.0, 154.3, 155.9

EI-MS: m/z 331 (M⁺)

Melting Point: 224-226 °C

HPLC-Retention Time: 6.5 min

1-(5-cyanopyridin-2-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)benzyl)urea (15)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.48 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.39 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.49 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.75 (1H, d, J = 8.9 Hz), 8.17 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 2.3 Hz), 8.18 (1H, s), 8.71 (1H, dd, J = 2.3 Hz, J = 0.6 Hz), 9.88 (1H, s)

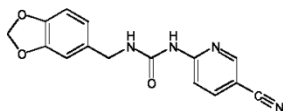
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.4, 101.4, 117.9, 121.4, 129.3, 139.6, 141.6, 147.6, 152.2, 154.4, 156.1

EI-MS: m/z 336 (M⁺)

Melting Point: 204 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-(5-cyanopyridin-2-yl)urea (16)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.29 (2H, d, J = 5.9 Hz), 5.99 (2H, s), 6.79 (1H, dd, J = 7.97 Hz, J = 1.6 Hz), 6.86 (1H, d, J = 7.9 Hz), 6.88 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.70 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.96 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.10 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 2.3 Hz), 8.64 (1H, dd, J = 2.3 Hz, J = 0.6 Hz), 9.74 (1H, s)

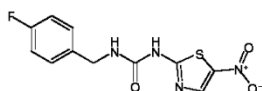
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.9, 101.2, 101.3, 108.2, 108.5, 111.7, 117.9, 120.7, 133.7, 141.6, 146.5, 147.7, 152.2, 154.3, 156.1

EI-MS: *m/z* 296 (*M*⁺)

Melting Point: 218 °C

HPLC-Retention Time: 5.6 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-nitrothiazol-2-yl)urea (17)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.28 (2H, d, J = 6 Hz), 7.1 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.29 (1H, s), 7.30 (2H, d, J = 8.7 Hz), 8.44 (1H, s), 11.64 (1H, s)

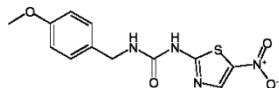
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.8, 115.3, 115.5, 129.6, 129.7, 135.5, 143.7, 164.6

EI-MS: *m/z* 296 (*M*⁺)

Melting Point: 168-170 °C

HPLC-Retention Time: 6.1 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-nitrothiazol-2-yl)urea (18)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.79 (3H, s), 4.36 (2H, d, J = 5.9 Hz), 6.96 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.29 (1H, s), 7.30 (2H, d, J = 8.7 Hz), 8.56 (1H, s), 11.67 (1H, s)

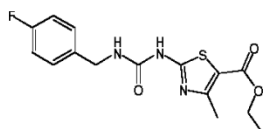
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 40.7, 53.1, 111.8, 126.7, 128.7, 141.5, 156.5, 162.8

EI-MS: m/z 308 (M⁺)

Melting Point: 211-213 °C

HPLC-Retention Time: 6.2 min

Ethyl-2-(3-(4-fluorobenzyl)ureido)-4-methylthiazole-5-carboxylate (19)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.48 (3H, s), 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.33 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.14 (1H, s), 7.17 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.35 (2H, d, J = 8.6 Hz), 10.94 (1H, s)

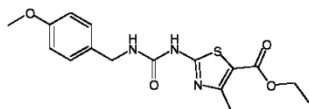
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 12.7, 15.3, 40.8, 58.7, 111.3, 113.6, 127.8, 134.0, 152.1, 154.9, 158.8, 160.2, 160.7

EI-MS: m/z 337 (M⁺)

Melting Point: 293-295 °C

HPLC-Retention Time: 6.4 min

Ethyl-2-(3-(4-methoxybenzyl)ureido)-4-methylthiazole-5-carboxylate (20)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.48 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.26 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.02 (1H, s), 7.23 (2H, d, J = 8.6 Hz), 10.83 (1H, s)

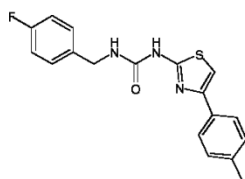
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 14.6, 17.4, 42.8, 55.4, 60.5, 113.1, 114.2, 129.1, 131.5, 153.9, 156.8, 158.8, 162.1, 162.6

EI-MS: m/z 349 (M⁺)

Melting Point: 243-247 °C

HPLC-Retention Time: 6.3 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(4-p-tolylthiazol-2-yl)urea (21)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.36 (3H, s), 4.38 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.07 (1H, t, J = 5.7 Hz), 7.21 (1H, m), 7.24 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.40 (3H, m), 7.78 (2H, d, J = 8.1 Hz), 10.73 (1H, s)

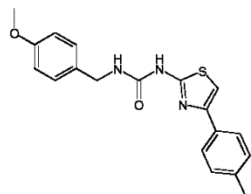
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 21.2, 42.6, 106.1, 115.4, 125.8, 129.5, 132.1, 136.2, 137.2, 149.0, 154.4, 160.1, 160.6, 162.6

EI-MS: m/z 341 (M⁺)

Melting Point: 179-180 °C

HPLC-Retention Time: 7.5 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-p-tolylthiazol-2-yl)urea (22)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.31 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.28 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 6.91 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.94 (1H, m), 7.20 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.36 (1H, s), 7.74 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 10.60 (1H, s)

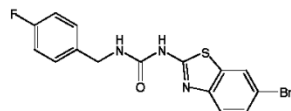
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 21.1, 42.7, 55.4, 106.0, 114.2, 125.8, 129.0, 129.6, 131.8, 132.2, 137.2, 149.0, 154.3, 158.7, 160.1

EI-MS: *m/z* 353 (*M*⁺)

Melting Point: 163 °C

HPLC-Retention Time: 7.4 min

1-(6-bromobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (23)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.41 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 7.22 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.29 (1H, s), 7.42 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.54 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.7 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 10.97 (1H, s)

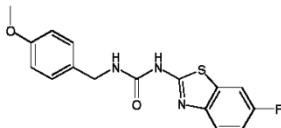
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.7, 114.7, 115.5, 121.6, 124.2, 129.1, 129.7, 134.1, 135.9, 154.2, 160.7, 160.9, 162.6

EI-MS: *m/z* 380 (*M*⁺)

Melting Point: 203-205 °C

HPLC-Retention Time: 7.4 min

1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)-urea (24)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.31 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.12 (1H, s), 7.20 (1H, m), 7.27 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.61 (1H, m), 7.79 (1H, m)

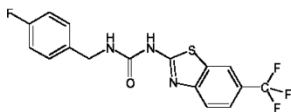
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.8, 55.4, 108.2, 113.9, 114.2, 121.0, 129.0, 131.5, 133.0, 154.1, 157.6, 158.7, 159.5, 160.1

EL-MS: m/z 331 (M⁺)

Melting Point: 296-299 °C

HPLC-Retention Time: 6.6 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(6-trifluoromethyl)benzo[d]thiazol-2-yl)urea (25)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.41 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.22 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.34 (1H, s), 7.42 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.71 (1H, dd, J = 8.5 Hz, J = 1.6 Hz), 7.82 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.43 (1H, s), 11.16 (1H, s)

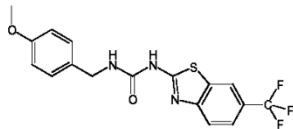
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.7, 115.5, 119.8, 120.3, 123.0, 124.0, 126.1, 129.7, 132.5, 135.8, 154.2, 160.7, 162.6, 163.3

EL-MS: m/z 369 (M⁺)

Melting Point: 188-190 °C

HPLC-Retention Time: 7.4 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(6-trifluoromethyl)benzo[d]thiazol-2-yl)urea (26)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.32 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.92 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.18 (1H, s), 7.26 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.66 (1H, dd, J = 8.5 Hz, J = 1.6 Hz), 7.76 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.36 (1H, s), 11.01 (1H, s)

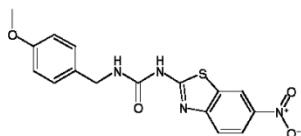
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.0, 55.4, 114.3, 119.8, 120.3, 123.0, 123.3, 124.0, 126.1, 129.1, 131.4, 152.4, 154.0, 158.8, 163.3

EI-MS: m/z 381 (M⁺)

Melting Point: 225-227 °C

HPLC-Retention Time: 7.3 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)urea (27)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.32 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.92 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.23 (1H, s), 7.26 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.75 (1H, d, J = 8.9 Hz), 8.21 (1H, dd, J = 8.9 Hz, J = 2.4 Hz), 8.94 (1H, d, J = 2.3 Hz), 11.23 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.9, 55.4, 114.4, 118.7, 119.8, 122.0, 129.1, 131.3, 132.6, 142.7, 155.8, 155.9, 158.7, 165.7

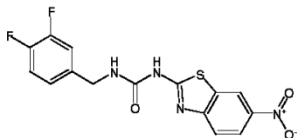
EI-MS: m/z 358 (M⁺)

HRMS: calcd. for C₁₆H₁₄N₄O₄S 358.0736, found 358.0717.

Melting Point: 270 °C

HPLC-Retention Time: 6.8 min

1-(3,4-difluorobenzyl)-3-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)urea (28)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.37 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 7.18 (1H, m), 7.4 (3H, m), 7.76 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 8.22 (1H, dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.94 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 11.42 (1H, s)

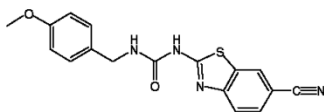
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.9, 118.0, 119.2, 120.3, 121.3, 123.4, 125.7, 134.0, 138.9, 144.1, 149.2, 150.1, 151.2, 152.0, 167.1

EI-MS: *m/z* 364 (*M*⁺)

Melting Point: 210-212 °C

HPLC-Retention Time: 7.1 min

1-(6-cyanobenzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (29)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ [ppm] = 3.73 (3H, s), 4.31 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.90 (2H, m), 7.25 (3H, m), 7.75 (2H, d, *J* = 1.1 Hz), 8.45 (1H, m), 11.34 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.4, 55.0, 104.2, 113.7, 119.3, 120.1, 120.1, 126.3, 128.6, 129.4, 130.9, 132.2, 152.3, 153.6, 158.3, 163.6

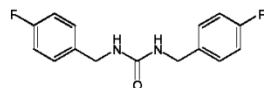
EI-MS: *m/z* 338 (*M*⁺)

HRMS: calcd. for C₁₇H₁₄N₄O₂S 338.0838, found 338.0840.

HPLC-Retention Time: 6.59 min

The precursor of compound **29** (2-aminobenzo[d]thiazole-6-carbonitrile) was synthesized according to following literature: Structural Chemistry, 2003, 14, 6, 587-595.

1,3-bis(4-fluorobenzyl)urea (30)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.26 (4H, d, J = 6.0 Hz), 6.51 (2H, t, J = 6.0 Hz), 7.18 (4H, d, J = 8.9 Hz), 7.33 (4H, d, J = 8.7 Hz)

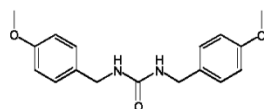
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.6, 115.1, 115.3, 129.2, 129.3, 137.4, 137.5, 158.4, 160.4, 162.4

EI-MS: m/z 276 (M⁺)

Melting Point: 218-220 °C

HPLC-Retention Time: 5.9 min

1,3-bis(4-methoxybenzyl)urea (31)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.78 (6H, s), 4.20 (4H, d, J = 6.0 Hz), 6.33 (2H, t, J = 5.9 Hz), 6.92 (4H, d, J = 8.7 Hz), 7.22 (4H, d, J = 8.7 Hz)

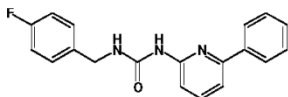
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.8, 55.4, 114.0, 128.7, 133.1, 158.3, 158.4

EI-MS: m/z 300 (M⁺)

Melting Point: 178-180 °C

HPLC-Retention Time: 5.5 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(6-phenylpyridin-2-yl)urea (32)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ [ppm] = 4.41 (2H, d, J = 5.5 Hz), 7.18 (2H, m), 7.29 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.40 (5H, m), 7.46 (1H, dd, J = 7.6 Hz, J = 0.6 Hz), 7.77 (3H, m), 8.78 (1H, t, J = 5.5 Hz), 9.45 (1H, s)

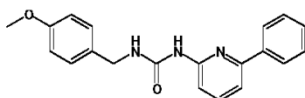
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.3, 110.5, 113.4, 115.1, 115.4, 126.2, 128.7, 129.0, 129.5, 129.6, 135.6, 135.7, 138.1, 139.3, 153.2, 153.5, 154.4

EI-MS: m/z 321 (M⁺)

Melting Point: 204-206 °C

HPLC-Retention Time: 6.8 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(6-phenylpyridin-2-yl)urea (33)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ [ppm] = 3.75 (3H, s), 4.35 (2H, d, J = 5.3 Hz), 6.93 (2H, m), 7.25 (1H, m), 7.30 (2H, m), 7.37 (3H, m), 7.45 (1H, m), 7.75 (3H, m), 8.80 (1H, s), 9.42 (1H, s)

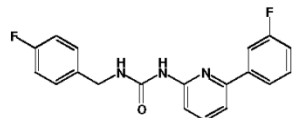
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.5, 55.2, 110.5, 113.3, 114.0, 126.2, 128.5, 129.1, 131.2, 138.1, 139.3, 153.2, 153.4, 154.6, 158.4

EI-MS: m/z 333 (M⁺)

Melting Point: 202-203 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(6-(3-fluorophenyl)pyridin-2-yl)urea (34)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.54 (2H, d, J = 5.6 Hz), 7.31 (2H, m), 7.38 (1H, m), 7.55 (4H, m), 7.67 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.80 (2H, m), 7.93 (1H, m), 8.60 (1H, t, J = 5.1 Hz), 9.57 (1H, s)

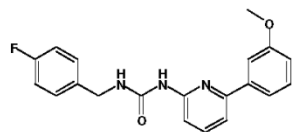
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.7, 112.6, 114.3, 114.5, 115.3, 116.5, 116.6, 116.8, 117.2, 117.4, 123.7, 130.8, 130.9, 132.1, 132.2, 137.3, 140.9, 154.7, 156.1, 161.7

EI-MS: m/z 339 (M⁺)

Melting Point: 158-159 °C

HPLC-Retention Time: 7.3 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(6-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (35)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.42 (2H, d, J = 5.6 Hz), 6.97 (1H, m), 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.35 (6H, m), 7.47 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.76 (1H, t, J = 8.3 Hz), 8.74 (1H, t, J = 5.3 Hz), 9.43 (1H, s)

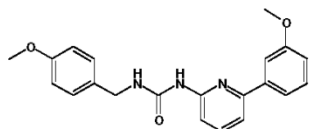
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.1, 55.0, 110.6, 111.5, 113.6, 114.8, 115.0, 115.3, 118.6, 129.2, 129.3, 129.8, 135.8, 139.2, 139.7, 153.1, 153.4, 154.8, 159.6

EI-MS: m/z 351 (M⁺)

Melting Point: 131 °C

HPLC-Retention Time: 7.0 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(6-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (36)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ [ppm] = 3.74 (6H, m), 4.35 (2H, d, J = 5.5 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.2 Hz), 6.97 (1H, m), 7.30 (5H, m), 7.40 (1H, s), 7.47 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.75 (1H, m), 8.71 (1H, s), 9.40 (1H, s)

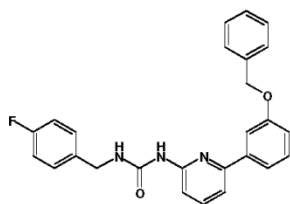
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.3, 55.1, 110.6, 111.5, 113.5, 113.8, 114.7, 118.5, 128.7, 129.6, 131.4, 139.4, 139.7, 153.2, 153.4, 154.7, 158.3, 159.6

EI-MS: m/z 363 (M⁺)

Melting Point: 186 °C

HPLC-Retention Time: 6.8 min

1-(6-(3-benzyloxy)phenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (37)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ [ppm] = 4.41 (2H, d, J = 5.7 Hz), 5.11 (2H, s), 7.10 (3H, m), 7.37 (10H, m), 7.47 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.53 (1H, m), 7.76 (1H, m), 8.74 (1H, t, J = 5.1 Hz), 9.43 (1H, s)

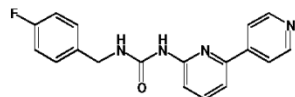
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.1, 69.2, 110.6, 112.7, 113.6, 115.0, 115.5, 118.7, 127.7, 127.9, 128.4, 129.2, 129.3, 129.8, 135.8, 136.9, 139.2, 139.7, 153.1, 153.3, 154.7, 158.8

EI-MS: m/z 427 (M⁺)

Melting Point: 159-160 °C

HPLC-Retention Time: 8.2 min

1-(2,4'-bipyridin-6-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (38)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.41 (2H, d, J = 5.5 Hz), 7.20 (2H, m), 7.42 (2H, m), 7.49 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.64 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.77 (2H, d, J = 4.5 Hz), 7.85 (1H, t, J = 7.7 Hz), 8.47 (1H, s), 8.61 (2H, d, J = 4.5 Hz), 9.51 (1H, s)

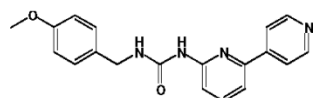
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.7, 112.8, 114.7, 115.5, 115.7, 120.8, 129.9, 130.0, 130.2, 130.3, 139.9, 145.4, 150.6, 151.4, 153.8, 154.9

EI-MS: m/z 322 (M⁺)

Melting Point: 206 °C

HPLC-Retention Time: 3.5 min

1-(2,4'-bipyridin-6-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (39)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.76 (3H, s), 4.35 (2H, d, J = 5.3 Hz), 6.95 (2H, m), 7.32 (2H, m), 7.44 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.63 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.72 (2H, d, J = 4.5 Hz), 7.84 (1H, m), 8.52 (1H, s), 8.57 (2H, d, J = 4.5 Hz), 9.49 (1H, s)

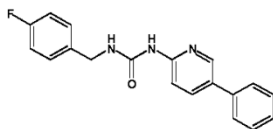
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.3, 54.7, 112.1, 113.6, 113.7, 120.1, 128.7, 130.8, 139.2, 144.7, 149.9, 150.5, 153.2, 154.1, 158.3

EI-MS: m/z 334 (M⁺)

Melting Point: 192 °C

HPLC-Retention Time: 2.8 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-phenylpyridin-2-yl)urea (40)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.44 (2H, d, J = 4.9 Hz), 7.00 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.27 (2H, m), 7.35 (4H, m), 7.55 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.90 (1H, dd, J = 8.7 Hz, J = 2.5 Hz), 8.37 (1H, d, J = 2.2 Hz), 8.79 (1H, s), 9.16 (1H, s)

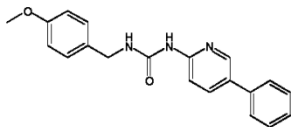
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 45.5, 115.0, 118.1, 129.5, 130.8, 132.2, 132.4, 132.9, 139.6, 139.9, 140.8, 147.6, 156.2, 164.1, 166.0

EI-MS: m/z 321 (M⁺)

Melting Point: 168-170 °C

HPLC-Retention Time: 5.8 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-phenylpyridin-2-yl)urea (41)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.35 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.77 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.18 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.22 (2H, m), 7.32 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.85 (1H, dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz), 8.31 (1H, d, J = 2.2 Hz), 8.8 (1H, s), 8.98 (1H, s)

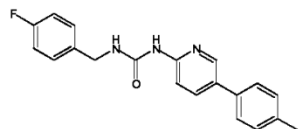
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.8, 55.9, 113.2, 115.1, 127.6, 128.7, 129.9, 130.2, 130.9, 133.4, 137.9, 138.8, 145.6, 154.4, 156.4, 160.2

EI-MS: m/z 333 (M⁺)

Melting Point: 134 °C

HPLC-Retention Time: 5.7 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-p-tolylpyridin-2-yl)urea (42)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.3 (3H, s), 4.41 (2H, d, J = 5.9 Hz), 6.95 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.14 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.6), 7.30 (2H, m), 7.38 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.84 (1H, dd, J = 8.6 Hz, J = 2.4 Hz), 8.30 (1H, d, J = 2.2 Hz), 8.8 (1H, s), 9.15 (1H, s)

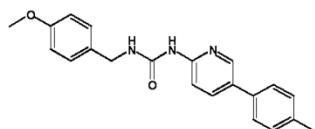
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 23.8, 46.0, 115.3, 118.4, 118.6, 129.8, 132.8, 133.2, 138.2, 140.1, 140.7, 147.7, 156.4, 158.8, 164.4, 166.4

EI-MS: m/z 335 (M⁺)

Melting Point: 182 °C

HPLC-Retention Time: 6.1 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-p-tolylpyridin-2-yl)urea (43)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.22 (3H, s), 3.63 (3H, s), 4.34 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.76 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.14 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.19 (3H, m), 7.38 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.82 (1H, dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz), 8.25 (1H, d, J = 2.3 Hz), 8.73 (1H, s), 8.98 (1H, s)

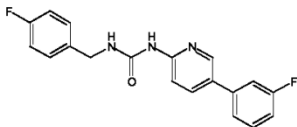
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 22.4, 44.8, 56.8, 113.8, 116.0, 128.4, 130.8, 131.8, 131.9, 134.4, 136.8, 138.7, 139.3, 146.2, 155.1, 157.2, 161.1

EI-MS: m/z 347 (M⁺)

Melting Point: 122-124 °C

HPLC-Retention Time: 6.0 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-(3-fluorophenyl)pyridin-2-yl)urea (44)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.40 (2H, d, J = 4.5 Hz), 6.97 (3H, m), 7.30 (4H, m), 7.37 (2H, m), 7.90 (1H, dd, J = 8.7 Hz, J = 2.5 Hz), 8.37 (1H, d, J = 2.3 Hz), 8.72 (1H, s), 9.02 (1H, s)

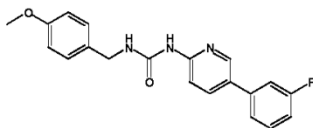
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 44.0, 113.6, 114.8, 115.9, 116.9, 124.1, 130.2, 131.1, 132.8, 138.2, 141.8, 146.5, 155.2, 164.2, 164.8, 166.2

EI-MS: m/z 339 (M⁺)

Melting Point: 176 °C

HPLC-Retention Time: 6.2 min

1-(5-(3-fluorophenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (45)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.35 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.76 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.98 (1H, m), 7.18 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.25 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.30 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.36 (2H, m), 7.88 (1H, dd, J = 8.7 Hz, J = 2.5 Hz), 8.36 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.80 (1H, s), 8.92 (1H, s)

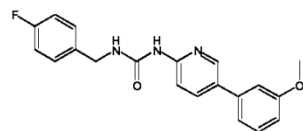
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.8, 55.9, 113.0, 114.1, 114.2, 115.1, 115.3, 123.5, 129.5, 129.9, 132.2, 133.4, 138.0, 141.2, 145.9, 154.8, 156.2, 160.2, 163.6, 165.6

EI-MS: m/z 351 (M⁺)

Melting Point: 162 °C

HPLC-Retention Time: 6.0 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (46)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.72 (3H, s), 4.41 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 1.7 Hz, *J* = 8.3 Hz), 6.96 (2H, m), 7.06 (2H, m), 7.22 (2H, m), 7.31 (2H, m), 7.86 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.33 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.77 (1H, s), 9.12 (1H, s)

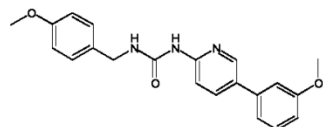
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.8, 56.0, 113.0, 114.4, 116.4, 119.9, 130.6, 130.9, 131.4, 137.8, 138.1, 140.2, 145.7, 154.4, 156.4, 161.7, 162.2, 164.8

EI-MS: *m/z* 351 (*M*⁺)

Melting Point: 124 °C

HPLC-Retention Time: 5.9 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (47)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 3.73 (3H, s), 4.34 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.06 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.24 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.85 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.32 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.76 (1H, s), 8.97 (1H, s)

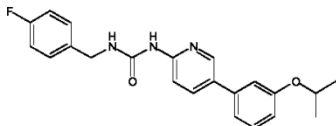
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.8, 55.9, 56.0, 112.9, 113.1, 114.3, 115.1, 119.8, 123.5, 129.9, 130.7, 131.4, 133.4, 138.0, 140.2, 145.7, 154.5, 156.4, 160.2, 161.7

EI-MS: *m/z* 363 (*M*⁺)

Melting Point: 140-142 °C

HPLC-Retention Time: 5.8 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-(3-isopropoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (48)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.18 (3H, d, *J* = 2.2 Hz), 1.19 (3H, d, *J* = 2.2 Hz), 4.41 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 4.58 (1H, m), 6.77 (1H, m), 6.95 (2H, m), 7.03 (2H, m), 7.21 (2H, m), 7.30 (2H, m), 7.85 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.32 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.81 (1H, s), 9.14 (1H, s)

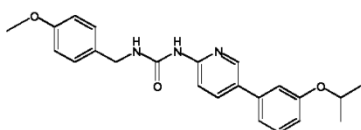
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 20.9, 41.8, 68.8, 111.1, 113.2, 114.3, 114.4, 117.8, 128.6, 129.1, 129.5, 136.2, 138.4, 143.8, 152.5, 154.6, 158.1, 160.4, 162.2

EI-MS: *m/z* 379 (*M*⁺)

Melting Point: 99-100 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(5-(3-isopropoxyphenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (49)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.17 (3H, d, *J* = 2.0 Hz), 1.19 (3H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.62 (3H, s), 4.35 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 4.57 (1H, m), 6.75 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.77 (1H, m), 7.02 (2H, m), 7.20 (4H, m), 7.83 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.98 (1H, s), 9.07 (1H, s)

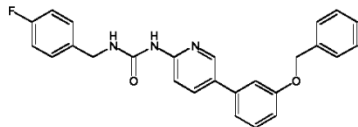
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 22.7, 43.9, 55.8, 70.7, 113.0, 115.0, 115.1, 116.1, 119.7, 129.8, 130.7, 131.4, 133.4, 138.1, 140.2, 145.6, 154.5, 156.6, 159.9, 160.4

EI-MS: *m/z* 391 (*M*⁺)

Melting Point: 126-128 °C

HPLC-Retention Time: 6.5 min

1-(5-(3-benzyloxy)phenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (50)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.40 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 5.07 (2H, s), 6.86 (1H, dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 7.5 Hz), 6.95 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.25 (8H, m), 7.37 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.86 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.34 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 8.74 (1H, s), 9.09 (1H, s)

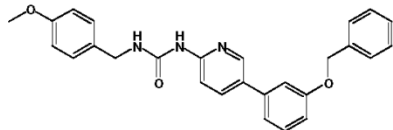
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.8, 71.0, 113.0, 114.1, 115.3, 116.2, 120.1, 120.7, 129.0, 129.7, 130.5, 130.8, 131.4, 137.8, 138.1, 138.8, 140.3, 145.8, 154.5, 156.4, 160.9, 164.1

EI-MS: *m/z* 427 (*M*⁺)

Melting Point: 144 °C

HPLC-Retention Time: 7.6 min

1-(5-(3-(benzyloxy)phenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (51)



¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.34 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 5.06 (2H, s), 6.76 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.4 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.20 (8H, m), 7.37 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.86 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz), 8.32 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.55 (1H, s), 8.90 (1H, s)

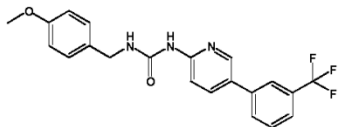
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 45.2, 57.3, 72.3, 112.9, 114.3, 115.4, 116.4, 121.5, 130.2, 130.4, 131.2, 131.3, 132.1, 132.6, 134.8, 139.4, 140.2, 141.7, 147.2, 155.8, 157.5, 161.6, 162.3

EI-MS: *m/z* 439 (*M*⁺)

Melting Point: 167 °C

HPLC-Retention Time: 7.3 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-(3-trifluoromethyl)phenyl)pyridin-2-yl)urea (52)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.34 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.77 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.18 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.28 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.57 (2H, m), 7.83 (2H, m), 7.95 (1H, dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz), 8.41 (1H, d, J = 2.3 Hz), 8.77 (1H, s), 8.88 (1H, s)

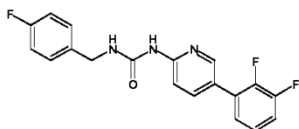
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.9, 55.8, 113.0, 115.1, 124.1, 125.2, 128.3, 130.0, 131.2, 131.4, 132.0, 132.2, 133.3, 138.2, 140.0, 146.1, 155.0, 156.2, 160.2

EI-MS: m/z 401 (M⁺)

Melting Point: 166 °C

HPLC-Retention Time: 6.8 min

1-(5-(2,3-difluorophenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (53)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] 4.59 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.12 (2H, m), 7.36 (3H, m), 7.45 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.48 (2H, m), 7.97 (1H, d, J = 8.6 Hz), 8.44 (1H, s), 9.18 (1H, s), 9.23 (1H, s)

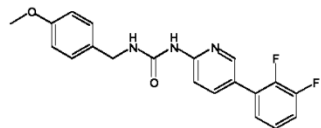
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.6, 112.8, 116.3, 117.7, 124.7, 126.2, 126.5, 130.4, 137.6, 139.8, 147.5, 154.8, 156.4, 162.1, 164.1

EI-MS: m/z 357 (M⁺)

Melting Point: 153 °C

HPLC-Retention Time: 6.7 min

1-(5-(2,3-difluorophenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (54)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.34 (2H, d, J = 5.9 Hz), 6.76 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.20 (5H, m), 7.30 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.85 (1H, m), 8.32 (1H, s), 8.74 (1H, s), 8.82 (1H, s)

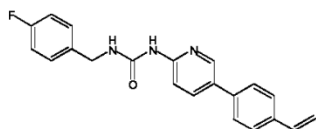
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 45.1, 57.1, 114.0, 116.2, 118.8, 118.9, 125.8, 127.4, 127.7, 130.3, 130.4, 131.2, 134.5, 141.0, 148.7, 156.3, 157.3, 161.4

EI-MS: m/z 369 (M⁺)

Melting Point: 160-162 °C

HPLC-Retention Time: 6.5 min

1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-vinylpyridin-2-yl)urea (55)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.58 (2H, d, J = 6.0 Hz), 5.30 (1H, d, J = 10.9 Hz), 5.90 (1H, d, J = 17.7 Hz), 6.83 (1H, dd, J = 10.9 Hz, J = 17.7 Hz), 7.13 (2H, m), 7.40 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.48 (2H, m), 7.60 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8.3 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.6 Hz), 8.52 (1H, s), 8.90 (1H, s), 9.25 (1H, s)

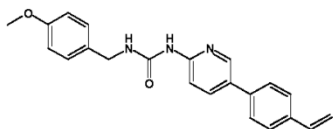
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.6, 113.0, 114.7, 116.1, 116.3, 127.7, 128.1, 130.4, 137.6, 137.8, 138.1, 138.2, 145.5, 154.3, 156.3, 164.0

EI-MS: m/z 347 (M⁺)

Melting Point: 172 °C

HPLC-Retention Time: 6.5 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(5-vinylpyridin-2-yl)urea (56)



¹H-NMR (Acetone-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.81 (3H, s), 4.53 (2H, d, J = 5.9 Hz), 5.30 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.89 (1H, d, J = 17.7 Hz), 6.83 (1H, dd, J = 10.7, J = 17.7 Hz), 6.93 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.39 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8.3 Hz), 8.04 (1H, d, J = 8.7 Hz), 8.51 (1H, s), 8.96 (1H, s), 9.16 (1H, s)

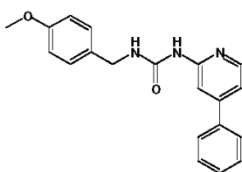
¹³C-NMR (Acetone-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 43.9, 55.8, 113.0, 114.7, 115.0, 127.6, 128.1, 129.9, 130.3, 133.4, 137.6, 137.7, 138.0, 138.2, 145.5, 154.4, 156.2, 160.1

EI-MS: m/z 359 (M^+)

Melting Point: 159 °C

HPLC-Retention Time: 6.4 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-phenylpyridin-2-yl)urea (57)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.33 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.25 (3H, m), 7.50 (3H, m), 7.68 (2H, m), 7.75 (1H, s), 8.23 (1H, d, J = 5.4 Hz), 8.60 (1H, s), 9.45 (1H, s)

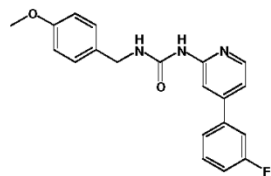
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.4, 55.4, 109.1, 114.1, 115.1, 127.0, 128.8, 129.5, 129.6, 132.3, 137.9, 147.8, 149.5, 154.6, 155.3, 158.6

EI-MS: m/z 333 (M^+)

Melting Point: 202 °C

HPLC-Retention Time: 5.9 min

1-(4-(3-fluorophenyl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (58)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ [ppm] = 3.72 (3H, s), 4.33 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.90 (2H, m), 7.30 (4H, m), 7.55 (3H, m), 7.72 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 8.24 (1H, dd, *J* = 5.4 Hz, *J* = 0.5 Hz), 8.4 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 9.31 (1H, s)

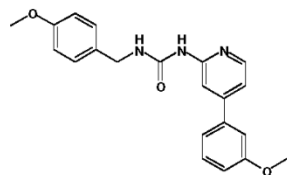
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ [ppm] = 42.1, 55.0, 108.8, 113.3, 113.6, 113.8, 114.8, 115.8, 116.1, 122.8, 128.4, 131.2, 131.3, 131.8, 139.9, 140.1, 147.6, 147.8, 154.1, 154.7, 158.2

EI-MS: *m/z* 351 (*M*⁺)

Melting Point: 166-168 °C

HPLC-Retention Time: 5.6 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (59)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.35 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.91 (2H, m), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.5 Hz), 7.20 (1H, m), 7.26 (4H, m), 7.44 (1H, m), 7.67 (1H, s), 8.23 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.51 (1H, s), 9.30 (1H, s)

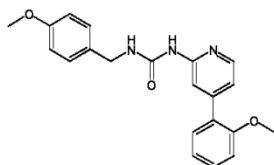
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 44.6, 57.5, 57.4, 111.3, 114.7, 116.6, 117.2, 117.4, 121.4, 130.9, 132.8, 134.3, 141.5, 149.8, 151.6, 156.6, 157.3, 160.7, 162.3

EI-MS: *m/z* 363 (*M*⁺)

Melting Point: 158 °C

HPLC-Retention Time: 5.6 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)urea (60)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.71 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.46 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.77 (2H, m), 6.91 (1H, dd, J = 0.5 Hz, J = 8.2 Hz), 6.97-7.00 (3H, m), 7.22-7.25 (3H, m), 7.28-7.32 (1H, m), 8.03 (1H, d, J = 5.9 Hz), 8.50 (1H, s), 9.51 (1H, s)

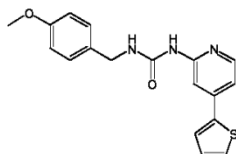
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.2, 54.3, 54.6, 110.4, 111.0, 111.3, 112.9, 115.6, 117.0, 120.0, 126.3, 127.6, 129.4, 130.5, 137.2, 152.1, 155.2, 155.6, 157.7

ESI-MS: m/z 364 (M+H)

HRMS: calcd. for C₂₁H₂₁N₃O₃ 363.1583, found 363.1542.

HPLC-Retention Time: 5.71 min

1-(4-methoxybenzyl)-3-(4-(thiophen2-yl)pyridin-2-yl)urea (61)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.71 (3H, s), 4.44 (2H, d, J = 5.7 Hz), 6.78 (2H, m), 7.05 (1H, dd, J = 1.2 Hz, J = 5.6 Hz), 7.07 (1H, dd, J = 3.7 Hz, J = 5.0 Hz), 7.15 (1H, s), 7.18 (1H, s), 7.23 (2H, m), 7.39 (1H, d, J = 4.8 Hz), 7.46 (1H, d, J = 2.9 Hz), 7.95 (1H, m), 9.2 (1H, s)

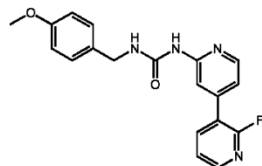
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.3, 54.2, 106.9, 112.8, 113.0, 125.2, 127.7, 130.1, 154.9, 157.8

ESI-MS: m/z 340 (M+H)

HRMS: calcd. for C₁₈H₁₇N₃O₂S 339.1042, found 339.1006.

HPLC-Retention Time: 5.29 min

1-(2-fluoro-3,4'-bipyridin-2'-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (62)



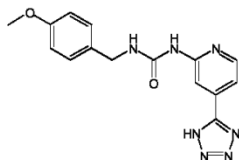
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.74 (3H, s), 4.34 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 6.91 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.17 (1H, m), 7.25 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.54 (1H, m), 7.72 (1H, s), 8.17 (1H, m), 8.29 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.30 (1H, s, br), 8.34 (1H, m), 9.37 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.1, 55.0, 111.0, 113.5, 113.7, 116.5, 122.8, 128.2, 128.4, 131.7, 141.3, 147.4, 147.8, 148.1, 153.9, 154.6, 158.3

EI-MS: *m/z* 352

HPLC-Retention Time: 4.23 min

1-(4-(1H-tetrazol-5-yl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (63)



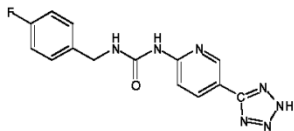
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.66 (3H, s), 4.26 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 6.83 (2H, m), 7.18 (2H, m), 7.43 (1H, d, *J* = 4.7 Hz), 8.00 (1H, s), 8.18 (1H, s), 8.31 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 9.40 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.1, 55.0, 108.6, 113.7, 114.1, 128.4, 131.6, 148.4, 154.2, 154.5, 158.2

EI-MS: *m/z* 325 (*M*⁺)

HPLC-Retention Time: 3.34 min

1-(5-(2H-tetrazol-5-yl)pyridin-2-yl)-3-(4-fluorobenzyl)urea (64)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 4.44 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.31 (1H, s), 8.32 (1H, dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz), 8.87 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 9.69 (1H, s)

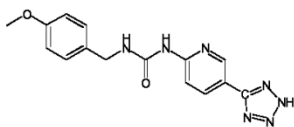
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 42.4, 112.0, 114.4, 115.5, 129.5, 136.4, 137.0, 146.2, 154.5, 155.4, 160.6, 162.5

EI-MS: *m/z* 313 (*M*⁺)

Melting Point: 148-150 °C

HPLC-Retention Time: 4.2 min

1-(5-(2H-tetrazol-5-yl)pyridin-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (65)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.64 (3H, s), 4.33 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.76 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.25 (1H, dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.3 Hz), 8.60 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 9.08 (1H, s)

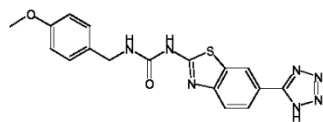
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 44.0, 55.8, 113.5, 115.0, 115.2, 129.9, 130.1, 133.0, 138.3, 146.5, 155.9, 156.6, 160.2

EI-MS: *m/z* 325 (*M*⁺)

Melting Point: 168-170 °C

HPLC-Retention Time: 3.9 min

1-(6-(1H-tetrazol-5-yl)benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-methoxybenzyl)urea (66)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 3.67 (3H, s), 4.24 (2H, d, J = 5.8 Hz), 6.80 (1H, m), 6.85 (2H, m), 7.10 (1H, m), 7.19 (2H, m), 7.72 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.94 (1H, dd, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz), 8.49 (1H, m), 10.90 (1H, s)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 44.4, 56.9, 115.5, 115.6, 115.7, 122.2, 126.6, 130.5, 130.6, 149.1, 150.8, 160.3

EI-MS: m/z Fragmente - 353, 338, 218, 175, 121

HPLC-Retention Time: 5.08 min

GSK-3 β *in vitro* assay

Purified GSK-3 β (0.5 μ g) was incubated in a reaction mixture of 50 mM Tris pH 7.3, 10 mM MgAc, 0.01% β -mercaptoethanol, 32 P[γ -ATP](100 μ M, 0.5 μ ci/assay), and 100 μ M of peptide substrate, pIRS-1 (RREGGMSRPAS(p)VDG (1). **New molecules** were added at various concentrations (1, 10 and 100 μ M), and the reaction mixture was incubated for 15 min at 30°C. The reactions were stopped, spotted on p81 paper (Whatman), washed with 10 mM phosphoric acid, and counted for radioactivity as described (1). GSK-3 β activity was calculated as the percentage of GSK-3 β activity in the absence of inhibitors that was designated to 100%.

Kinase Panel:

Compounds are serially diluted 1/3 in neat DMSO (10 serial dilutions) and these dilutions are further diluted 1/25 with reaction buffer. 2.5 μ l of these solutions are added to the reaction mixture described below so that final compound concentration in the assay ranges from 100 μ M to 5 nM in 1% (v/v) DMSO. The enzymatic activity of the kinases is determined with a commercial system based on the Z'-LYTE[®] technology, available from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), using human recombinant kinases as the enzyme source. This technology utilizes the fluorescence resonance energy transfer ("FRET") process between fluorescein and coumarin. The assay principle is based on the differential sensitivity of phosphorylated and non-phosphorylated peptide to proteolytic cleavage, which precludes the energy transfer process between the two fluorophores attached to both sides of the cleavage site. Hence, enzymatic phosphorylation will yield a phosphopeptide, which cannot be hydrolyzed by a suitable protease and energy transfer between the two fluorophores will occur. Opposingly, lack of phosphorylation will cause peptide hydrolysis hence lack of energy transfer as. The assay is performed in 96-well black plates, in a final volume of 10 μ l, with components as detailed in Table 1.

Table 1

Kinase	Enzyme conc. (nM)	ATP conc. (μ M)	Peptide used	Peptide conc. (μ M)	Buffer
GSK3 β	0.54	26	Ser/Thr 9 peptide	2	50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.01% (w/v) Brij-35
CKI ϵ	18.84	32	Ser/Thr 11 peptide	2	50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.01% (w/v) Brij-35
Cdk5	15.9	12.5	Ser/Thr 12 peptide	2	50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.01% (w/v) Brij-35
AurKA	20	10	Ser/Thr 1 peptide	2	50 mM Hepes pH 7.5, 20 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.01% (w/v) Brij-35
PKC α	1.04	1	Ser/Thr 7 peptide	2	50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.01% (w/v) Brij-35

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bei der Erforschung diagnostischer und therapeutischer Ansätze für die Alzheimer'sche Krankheit zusammenfassend dargestellt.

Es wurden verschiedene fluoreszente Verbindungsklassen synthetisiert, welche in weiterführenden Studien auf ihren möglichen Einsatz als fluoreszente Marker für die pathologischen Merkmale der Alzheimer'schen Krankheit untersucht wurden. Die dabei bearbeiteten Substanzklassen umfassen Imidazolpyridine **12**, Benzohydrazide **13**, Chromenylidenhydrazide **14**, Bis(phenothiazinylpropyl)piperazine **15**, Pyrazole **16**, Phenylthiazolhydrazide **17**, Thiazolylharnstoffe **18**, Bis(arylvinyl)pyrimidine **19**, Bis(arylvinyl)pyrazine **20** und Distyrylbenzole **21**.

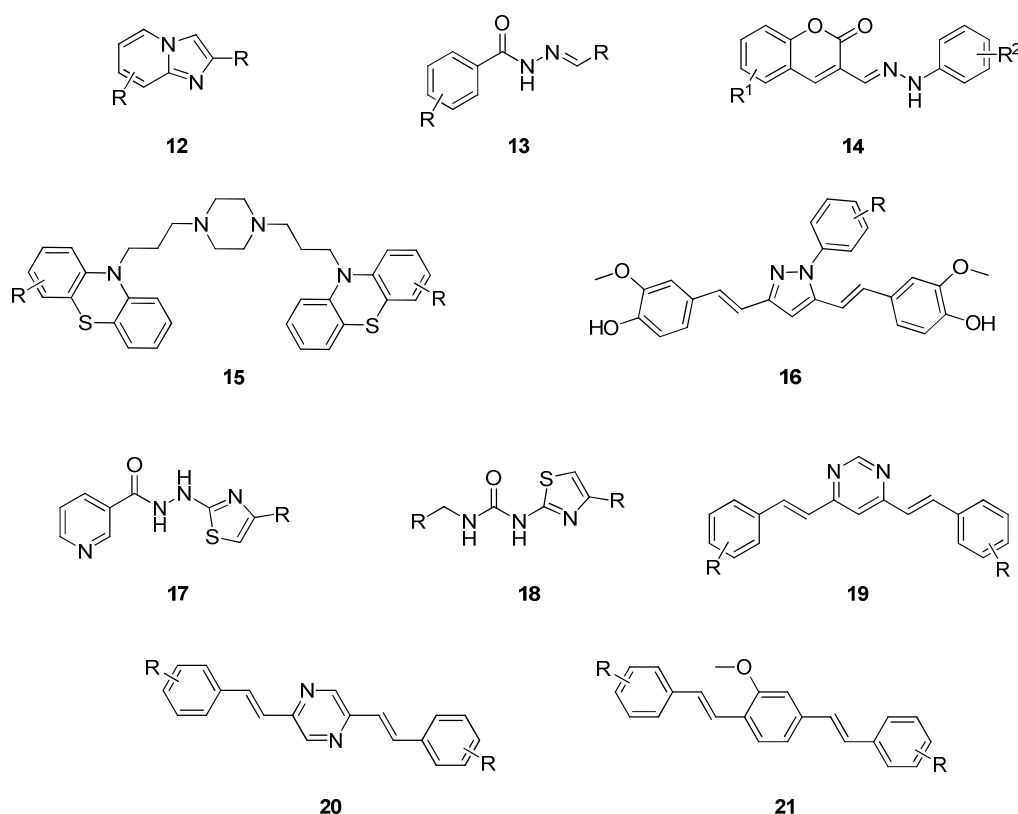


Abbildung 17: Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Substanzklassen: Imidazolpyridine **12**, Benzohydrazide **13**, Chromenylidenhydrazide **14**, Bis(phenothiazinylpropyl)piperazine **15**, Pyrazole **16**, Phenylthiazolhydrazide **17**, Thiazolylharnstoffe **18**, Bis(arylvinyl)pyrimidine **19**, Bis(arylvinyl)pyrazine **20** und Distyrylbenzole **21**.

Wie bereits in Abschnitt 1.5 erwähnt, werden radioaktiv markierte Imidazolpyridine **12** (IMPY) als SPECT-Proben eingesetzt. Durch die Erweiterung des IMPY-Grundgerüsts mit fluoreszenten Resten konnten als Fluoreszenzmarker geeignete Derivate erhalten werden. Bis(phenothiazinylpropyl)piperazine **15** leiten sich von Methylenblau ab. Bei diesem handelt es sich ebenfalls um ein Phenothiazin-Derivat, welches wie bereits in Abschnitt 1.4.2 beschrieben bezüglich seiner Eignung als Tau-Aggregationsinhibitor untersucht wird. Die strukturelle Motivation der Verbindungsklassen **16-21** wurde in Kapitel 3 erläutert.

Die synthetisierten Substanzklassen wurden zunächst auf humanen Ammonshornpräparaten mit AD-Pathologie untersucht. Die Affinität zu Tau-Fibrillen und A β -Plaques wurde hierbei qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die fluoreszenzmikroskopische Bewertung der Färbeergebnisse erfolgte durch Vergleiche mit immunhistologischen Antikörperfärbungen von Gewebeschnitten der gleichen Gewebeprobe. Dabei wurden Antikörper verwendet, die selektiv an die jeweiligen AD-spezifischen Aggregate binden. Bei den oben genannten untersuchten Substanzklassen haben sich dabei Phenylthiazolhydrazide **17**, Thiazolylharnstoffe **18**, Bis(arylvinyl)pyrimidine **19**, Bis(arylvinyl)pyrazine **20** und Distyrylbenzole **21** als aktiv herausgestellt.

Die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gilt nach wie vor als Maßstab für die Entwicklung neuer histochemischer Farbstoffe. Allerdings ist bekannt, dass durch die Färbung mit dem standardmäßig angewandten Antikörper *anti-PHF-Tau clone AT8 mAb* lediglich 38 % der Tau-Fibrillen markiert werden.^[160] Vor allem sogenannte *ghost tangles*, die von Neuronen nach deren Zelldegeneration freigesetzt werden und als extrazelluläre Tau-Aggregate erscheinen, lassen sich nicht immunhistologisch anfärben. Ihr Auftreten ist typisch für Spätstadien von AD und ihr Nachweis ist deshalb für eine *post mortem* Klassifikation von AD-Fällen von Bedeutung. Mit Bis(arylvinyl)pyrimidinen **19** und -pyrazinen **20** konnten auch solche extrazellulären Fibrillen markiert werden (Abbildung 19 A). Ebenso wurden AD-bedingte Amyloidablagerungen (A β -Ablagerungen in Blutgefäßwänden des Gehirns) angefärbt.^[161] (Abbildung 19 B).

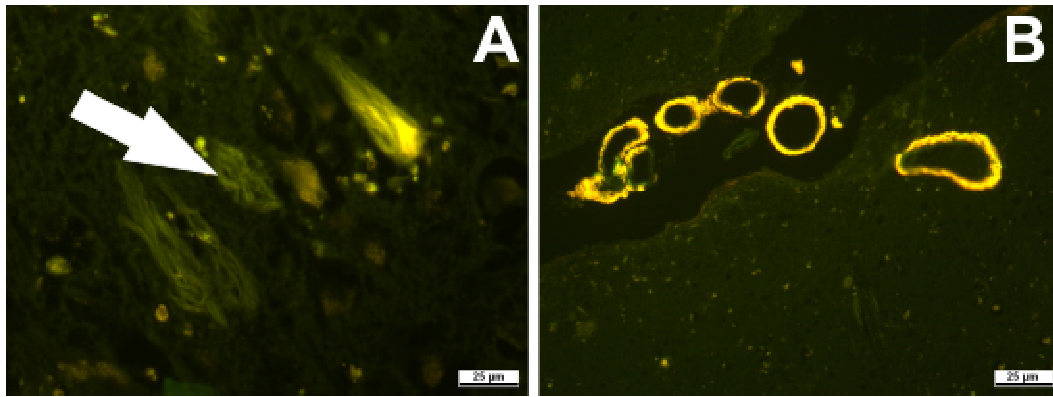


Abbildung 19: Histochemische Färbung extrazellulärer Tau-Fibrillen (**A**, pfeilmarkiert) und Amyloidangiopathien (**B**) auf humanem Ammonshorngewebe (Färbung mit **5a** aus Kapitel 3.1.2, Filter-Set 09B450-490, FT510, LP515).

Anhand dieser Befunde kann festgehalten werden, dass mit diesen Fluoreszenzmarkern eine histochemische Färbung sämtlicher bekannter mit AD in Verbindung stehender Proteinaggregate möglich ist, wobei in vielen Fällen sogar die immunhistologische Referenzfärbung übertroffen wird.

Die aus histochemischen Färbexperimenten erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Eignung eines Fluoreszenzmarkers sind qualitativer Art, geben nur geringen Aufschluss über absolute Affinitäten der untersuchten Liganden zu den favorisierten Targets und sind untereinander nicht direkt vergleichbar. Daher wurden die Substanzen, welche nach histochemischer Evaluation als besonders geeignet erschienen, in einem neu entwickelten Affinitätsassay der Firma F. Hoffmann-La Roche untersucht, in dem ihre IC_{50} -Werte für aggregiertes Tau und $A\beta_{40}$ bestimmt wurden. Anhand dieser Bindungsaffinitäten konnten dann Marker ausgewählt werden, die sich aufgrund ihrer hohen Affinität zu Tau oder $A\beta$ für zukünftige *in vivo* Anwendungen eignen könnten.

In Zusammenarbeit mit dem Klinikum Darmstadt ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die Lokalisierung von Tau-Aggregaten innerhalb der Riechschleimhaut genau zu bestimmen: In Verbindung mit einer neuen Präparationstechnik, bei der die Riechschleimhaut im formalinfixierten Zustand vom Knochen der sie umgebenden Nasenhöhle gelöst wird, konnten die Bowman-Drüsen der Lamina propria durch histochemische Färbung in Übereinstimmung mit immunhistologischer Markierung als Orte von Tau-Ablagerungen identifiziert werden (Abbildung 20). Sie spielen eine Rolle bei der Sekretion von Mucinen,

den strukturgebenden Bestandteilen des Nasensekrets, wobei ihre genaue Funktion noch weitgehend unbekannt ist.^[162] Das Ausmaß der Tau-Belastung der Bowman-Drüsen und inwiefern diese mit der Tau-Pathologie im Gehirn von AD-Patienten korreliert, ist Gegenstand weiterführender Studien. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass Tau-Aggregate innerhalb der BD als valide Biomarker für AD angesehen werden könnten.

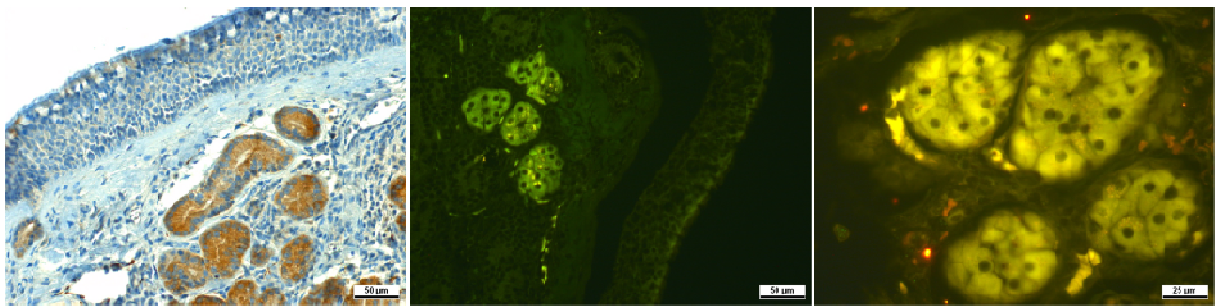


Abbildung 20: Immunhistologische Färbung von Tau-Aggregaten innerhalb der Bowman-Drüsen der Lamina propria des Riechepithels (links) und histochemische Färbung der gleichen Strukturen (*Mitte*: Färbung mit **6a** aus Kapitel 3.1.2 *rechts*: Färbung mit **5a** aus Kapitel 3.1.2; Filter-Set 09B450-490, FT510, LP515).

Dies eröffnet die Möglichkeit der Entwicklung neuer nichtinvasiver Endoskopieverfahren basierend auf den Methoden der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie, da sowohl die Zugänglichkeit des Riechepithels als auch die Möglichkeit der selektiven Markierung durch die entsprechenden Fluoreszenzmarker hinreichend gewährleistet ist.

Obwohl Aggregate der Proteine Tau und Amyloid- β als pathologische Merkmale von AD bereits seit langem bekannt sind, geschah die Entwicklung möglicher diagnostischer oder therapeutischer Ansätze ohne genaue Kenntnis über ihren genauen strukturellen Aufbau. Zwar ist bekannt, dass beide Bereiche eine β -Faltblattstruktur über weite Teile ihrer Aminosäuresequenz besitzen, auf welche Weise jedoch Wirkstoffe oder Marker in Form kleiner Molekülen mit ihnen wechselwirken, ist weitgehend unerforscht. Eine Erforschung solcher Wechselwirkungen ist jedoch im Sinne zukünftiger biochemischer Studien zur Entwicklung von Präventions- und Therapiestrategien dringend erforderlich.

Ein erster Hinweis auf diese Art der Wechselwirkung wurden durch die Färbung von Rinderinsulin mit Thioflavin T **8** gewonnen.

Anhand von VIS-CD-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Thioflavin T **8** als optisch inaktives Fluorophor nach seiner Bindung an Fibrillen aus β -Faltblattkonformeren einen starken negativen Cotton-Effekt bei etwa 450 nm zeigt, wobei dieser Wert dem Absorptionsmaximum des Thioflavin-Proteinkomplexes entspricht.^[163] Dabei steigt das gemessene CD-Signal linear mit zunehmender Menge gebundenen Thioflavins an. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Thioflavin durch die Wechselwirkung mit dem Protein in ein stabiles optisch aktives Konformer überführt wird. Anhand von DFT-Rechnungen wurde die Struktur dieses gebundenen optisch aktiven Konformers berechnet. Dabei wurde ein Torsionswinkel ψ von $+34.6^\circ$ zwischen den Molekülebenen eines isolierten Thioflavin T **8**-Kations berechnet (Abbildung 21).

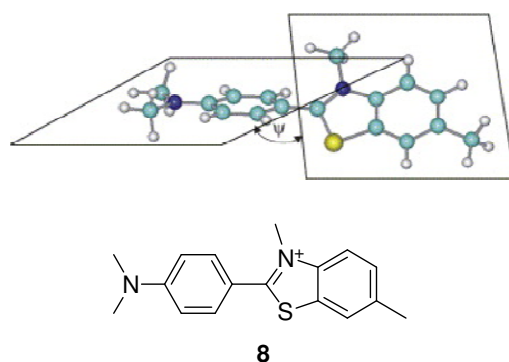


Abbildung 21: Darstellung des anhand von DFT-Rechnungen ermittelten verdrehten Konformers von Thioflavin T **8** durch Bindung an Fibrillen aus β -Faltblatteinheiten. Der berechnete Torsionswinkel ψ beträgt $+34.6^\circ$.^[163]

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist auch eine Optimierung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fluoreszenzmarker dahingehend denkbar, dass im umgekehrten Fall eine strukturell bedingte Verdrillung eines Markermoleküls eine Steigerung dessen Selektivität zu den favorisierten Targets in Form von Tau- oder A β -Aggregaten bedingen könnte. Dies könnte im Fall der Bis(arylvinyl)pyrimidine **19** und Bis(arylvinyl)pyrazine **20** durch die Einführung von Seitenketten in die Phenylenvinyl-Äste erreicht werden, die aufgrund sterischer Wechselwirkungen eine ähnlich verdrehte Molekülkonformation induzieren (Abbildung 22).

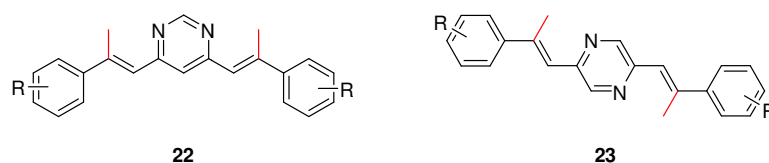


Abbildung 22: Durch zusätzliche Seitenketten (hier durch Methylgruppen, rot gekennzeichnet) konnten verdrehte Bis(arylvinyl)pyrimidine **22** und Bis(arylvinyl)pyrazine **23** mit erhöhter Affinität zu Fibrillen aus β -Faltblatteinheiten erhalten werden.

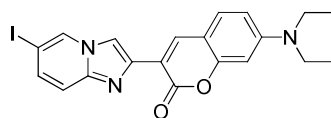
Außerdem wurde kürzlich von der Aufklärung der Atomstrukturen von Komplexen aus Segmenten von Modellproteinen der AD und kleinen organischen Molekülen berichtet.^[164] Dabei binden die Moleküle unter paralleler Ausrichtung ihrer Längsachse zur Fibrillenachse, wobei spezifische Marker Salzbrücken mit Seitenketten des Fibrillenrückgrats ausbilden, nichtspezifische Marker hingegen in zylindrische Kavitäten des Proteins eingelagert werden. Die beschriebenen Komplexe liefern wichtige Anhaltspunkte für die strukturbasierte Optimierung sowohl von selektiven Markierungssubstanzen als auch von Inhibitoren der Proteinaggregation für die Alzheimer'sche Krankheit.

5. Experimenteller Teil nicht publizierter Substanzen

7-(Diethylamino)-3-(6-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)-2*H*-chromen-2-on

BSc4014

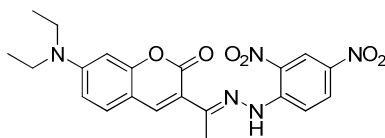
3-(2-Chloroacetyl)-7-(diethylamino)-2*H*-chromen-2-on (38 mg, 0.13 mmol), 5-Iod-2-amino-pyridin (28 mg, 0.13 mmol) und NaHCO₃ (20 mg, 0.23 mmol) werden in Ethanol gelöst und über zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Reinigung wird das Produkt (49 mg, 0.11 mmol, 86 %) als gelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.61 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.32 (m, 3H), 6.57 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 3.37 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H) ppm.

(*E*)-7-(Diethylamino)-3-(1-(2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazono)ethyl)-2*H*-chromen-2-on BSc5018

3-Acetyl-7-(diethylamino)-2*H*-chromen-2-on (277 mg, 1.2 mmol) und (2,4-Dinitrophenyl)hydrazin (211 mg, 1.2 mmol) werden in einer 1:1-Mischung aus CHCl₃ und Methanol gelöst und über zwei Stunden bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur kann das Produkt (500 mg, 1.14 mmol, 95 %) als roter Feststoff abfiltriert werden.

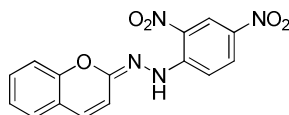


¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 11.37 (s, 1H), 9.17 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.34 (m, 1H), 8.07 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (m, 1H), 6.51 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.46 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 2.50 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 160.8, 157.2, 152.2, 151.6, 144.7, 142.5, 138.2, 130.1, 130.0, 129.6, 123.6, 117.7, 116.7, 109.5, 108.4, 97.0, 45.0, 15.5, 12.5 ppm.

(E)-1-(2H-Chromen-2-yliden)-2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazin BSc5019

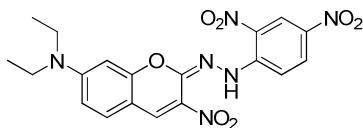
2H-Chromen-2-on (436 mg, 3 mmol) und (2,4-Dinitrophenyl)hydrazin (591 mg, 3 mmol) werden in einer 1:1-Mischung aus CHCl_3 und Methanol gelöst und über zwei Stunden bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur kann das Produkt (900 mg, 2.8 mmol, 92 %) als violetter Feststoff abfiltriert werden.



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 11.76 (s, 1H), 9.16 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.31 (m, 1H), 7.94 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.11 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 9.4 Hz, 1H) ppm.

(E)-2-(2-(2,4-Dinitrophenyl)hydrazono)-N,N-diethyl-3-nitro-2H-chromen-7-amin BSc5020

7-(Diethylamino)-3-nitro-2H-chromen-2-on (66 mg, 0.25 mmol) und (2,4-Dinitrophenyl)hydrazin (50 mg, 0.25 mmol) werden in einer 1:1-Mischung aus CHCl_3 und Methanol gelöst und über zwei Stunden bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur kann das Produkt (98 mg, 0.22 mmol, 89 %) als dunkelroter Feststoff abfiltriert werden.

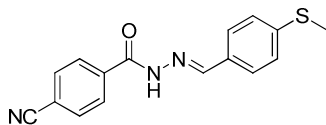


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 11.76 (s, 1H), 9.16 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.31 (m, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.94 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 3.46 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm.

(E)-4-Cyano-N-(4-(methylthio)benzylidene)benzohydrazid BSc5022

4-Cyanobenzhydrazid (85 mg, 0.53 mmol) und 4-(Methylthio)benzaldehyd (80 mg, 0.53 mmol) werden in 2 mL MeOH und über 2h bei 120 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf

Raumtemperatur kann das Produkt als gelber Feststoff abfiltriert werden (132 mg, 0.45 mmol, 85%).

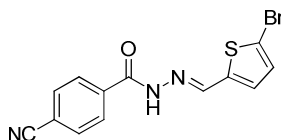


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz): δ = 12.00 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz): δ = 161.4, 148.3, 137.5, 130.5, 130.0, 128.4, 127.6, 127.2, 125.6, 118.2, 114.0, 14.2 ppm.

(*E*)-*N*-((5-Bromothiophen-2-yl)methylene)-4-cyanobenzohydrazid BSc5021

4-Cyanobenzhydrazid (45 mg, 0.28 mmol) und 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd (53 mg, 0.28 mmol) werden in 2 mL MeOH und über 2h bei 120 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur kann das Produkt als gelber Feststoff abfiltriert werden (80 mg, 0.24 mmol, 87%).



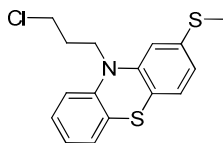
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz): δ = 11.9 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.54 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz): δ = 163.2, 149.8, 134.4, 130.5, 131.2, 129.1, 127.3, 127.0, 124.9, 119.1, 115.4, 115.7 ppm.

3-Chlorpropylierung von *NH*-Heterozyklen

Gemäß Literaturvorschrift werden *NH*-Heterozyklen mit 1-Chlor-3-Iodpropan umgesetzt.^[165]

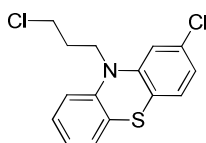
10-(3-Chloropropyl)-2-(methylthio)-10*H*-phenothiazin **BSc4177**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.13 (m, 2H), 7.06 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.64 (t, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.21 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 146.9, 145.3, 139.1, 128.7, 128.3, 127.4, 127.2, 125.0, 122.3, 122.1, 121.8, 115.2, 115.1, 43.6, 41.9, 30.0 ppm.

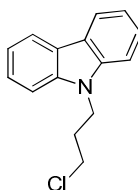
2-Chloro-10-(3-chloropropyl)-10*H*-phenothiazin **BSc5023**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.21 (m, 2H), 7.12 (m, 1H), 6.95 (m, 2H), 6.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.46 (m, 2H), 3.74 (t, 2H), 2.71 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 145.9, 145.2, 138.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 126.2, 123.3, 123.1, 121.5, 116.2, 115.0, 44.5, 42.8, 30.0, 16.9 ppm.

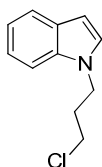
9-(3-Chloropropyl)-9*H*-carbazol **BSc5025**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.09 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.41 (m, 4H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.42 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.26 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 140.9, 126.3, 120.9, 119.7, 109.2, 42.8, 40.2, 32.2 ppm.

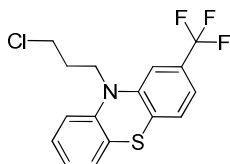
1-(3-Chloropropyl)-1H-indol BSc5027



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.65 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 6.50 (m, 1H), 4.27 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.19 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 136.3, 128.4, 122.1, 119.9, 109.7, 101.9, 60.8, 43.3, 42.3, 33.1, 21.5, 14.7 ppm.

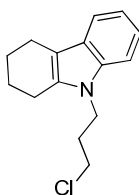
10-(3-Chloropropyl)-2-(trifluoromethyl)-10H-phenothiazin BSc5024



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.36 (m, 4H), 7.12 (m, 3H), 4.28 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.83 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.40 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 145.9, 144.5, 130.9, 130.2, 128.1, 128.0, 125.1, 123.8, 119.8, 116.3, 112.4, 60.7, 44.5, 42.5, 29.8, 14.6 ppm.

9-(3-chloropropyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol BSc5026



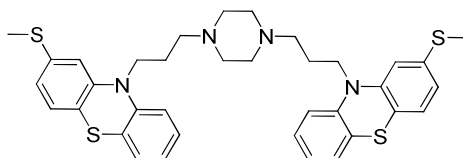
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.15 (m, 2H), 4.16 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.46 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.71 (m, 4H), 2.17 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 133.7, 132.8, 125.0, 118.3, 117.0, 116.4, 113.63, 108.7, 37.2, 33.0, 30.5, 29.5, 27.3, 24.6, 18.4 ppm.

Synthese von 1,4-Dipropylpiperazin-verbrückten *NH*-Heterozyklen

Gemäß Literaturvorschrift werden 3-chlorpropylierte *N*-Heterozyklen zu 1,4-Dipropylpiperazin-verbrückten *N*-Heterozyklen umgesetzt.^[165]

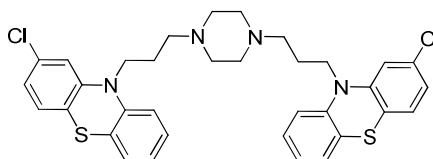
1,4-Bis(3-(2-(methylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl)propyl)piperazin **BSc4179**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.09 (m, 4H), 7.02 (m, 2H), 6.85 (m, 4H), 6.78 (m, 4H), 3.90 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.42 (m, 18 H), 1.94 (q, J = 6.6 Hz, 4H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 145.6, 144.9, 137.5, 127.5, 127.4, 127.2, 125.2, 122.5, 122.2, 120.8, 115.7, 114.7, 55.6, 53.1, 45.2, 24.2, 16.5 ppm.

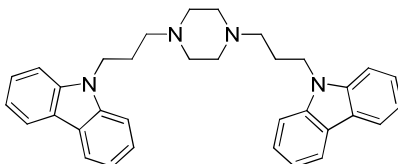
1,4-Bis(3-(2-chloro-10*H*-phenothiazin-10-yl)propyl)piperazin **BSc4180**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.14 (m, 4H), 7.10 (m, 2H), 7.00 (m, 2H), 6.92 (m, 2H), 6.85 (m, 4H), 6.83 (s, 2H), 6.78 (m, 4H), 3.88 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.40 (m, 12 H), 1.94 (q, J = 6.6 Hz, 4H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 146.8, 144.8, 133.6, 128.2, 127.9, 127.8, 125.1, 123.9, 123.2, 122.6, 116.3, 116.2, 100.0, 55.8, 53.4, 45.7, 24.5 ppm.

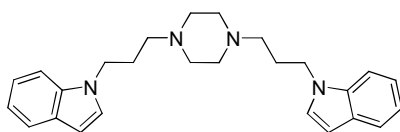
1,4-Bis(3-(9*H*-carbazol-9-yl)propyl)piperazin **BSc4182**



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.12 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.46 (m, 8H), 7.23 (m, 4H), 4.41 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 2.45 (m, 8H), 2.34 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 2.06 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 140.9, 126.2, 125.9, 123.2, 120.8, 120.6, 119.2, 109.3, 55.4, 53.5, 40.9, 26.3 ppm.

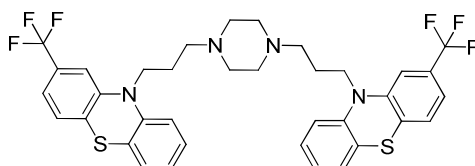
1,4-Bis(3-(1H-indol-1-yl)propyl)piperazin BSc5028



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.72 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.21 (m, 2H), 7.18 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 6.45 (m, 2H), 4.41 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 2.45 (m, 8H), 2.34 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 2.06 (m, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 137.4, 129.3, 124.8, 120.4, 120.6, 118.3, 108.4, 99.8, 57.2, 54.7, 52.3, 28.7 ppm.

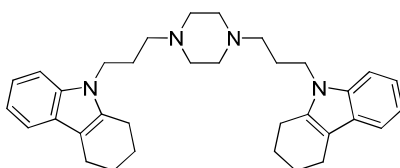
1,4-Bis(3-(2-(trifluoromethyl)-10H-phenothiazin-10-yl)propyl)piperazin BSc4181



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.19 (m, 8H), 7.02 (s, 2H), 6.96 (m, 4H), 3.94 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 2.39 (m, 4H), 2.46 (m, 8H), 1.93 (m, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 146.1, 145.7, 144.7, 130.3, 130.1, 129.8, 128.0, 127.8, 125.6, 124.5, 123.5, 119.4, 116.3, 112.3, 55.7, 53.6, 51.2, 45.7, 24.5 ppm.

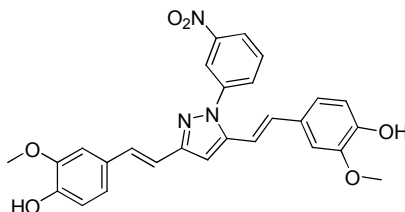
1,4-Bis(3-(3,4-dihydro-1H-carbazol-9(2H)-yl)propyl)piperazin BSc4183



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.12 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.23 (m, 4H), 4.41 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 2.45 (m, 8H), 2.34 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 3.59 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.71 (m, 4H), 2.06 (m, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 140.9, 126.2, 125.9, 123.2, 120.8, 120.6, 119.2, 109.3, 55.4, 53.5, 40.9, 26.3, 33.0, 30.5, 29.5, 27.3, 18.4 ppm.

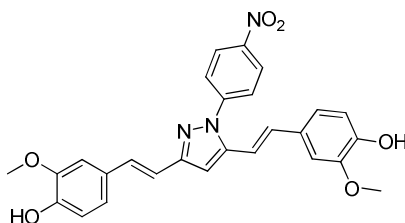
4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(1-(3-Nitrophenyl)-1*H*-pyrazole-3,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(2-methoxyphenol) BSc5015^[158]



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.478 (s, 1H), 8.239 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.921 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.678 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.156 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.117 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.086 (m, 1H), 7.017 (m, 1H), 7.006 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 6.980 (m, 1H), 6.936 (m, 1H), 6.919 (s, 2H), 6.903 (s, 2H), 6.884 (s, 1H), 6.712 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 5.759 (s, 2OH), 3.935 (s, 3H), 3.908 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 145.12, 127.44, 127.32, 124.76, 122.52, 115.40, 50.20, 47.55, 46.42, 11.71 ppm.

4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(1-(3-Nitrophenyl)-1*H*-pyrazole-3,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(2-methoxyphenol) BSc5016^[158]



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 8.378 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.770 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.155 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.112 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.096 (s, 1H), 7.012 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.017 (m, 2H), 6.926 (m, 2H), 6.828 (s, 1H), 6.723 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 5.732 (s, 2OH), 3.948 (s, 3H), 3.927 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 145.12, 127.44, 127.32, 124.76, 122.52, 115.40, 50.20, 47.55, 46.42, 11.71 ppm.

6. Literaturverzeichnis

- [1] World Alzheimer Report, **2011**.
- [2] K. A. Jellinger, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* **2006**, *113*, 1603-1623.
- [3] A. Barco, C. H. Bailey, E. R. Kandel, *Journal of Neurochemistry* **2006**, *97*, 1520-1533.
- [4] E. R. Kandel, *Bioscience reports* **2001**, *21*, 565-611.
- [5] H. Forstl, A. Kurz, *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **1999**, *249*, 288-290.
- [6] R. T. Linn, P. A. Wolf, D. L. Bachman, J. E. Knoefel, J. L. Cobb, A. J. Belanger, E. F. Kaplan, R. B. D'Agostino, *Arch Neurol* **1995**, *52*, 485-490.
- [7] A. D. Smith, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 4135-4137.
- [8] B. H. Ridha, J. Barnes, L. A. van de Pol, J. M. Schott, R. G. Boyes, M. M. Siddique, M. N. Rossor, P. Scheltens, N. C. Fox, *Arch Neurol* **2007**, *64*, 849-854.
- [9] A. Alzheimer, *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* **1907**, *64*, 146-148.
- [10] H. Braak, E. Braak, *Acta neuropathologica* **1991**, *82*, 239-259.
- [11] D. R. Thal, U. Rub, C. Schultz, I. Sassin, E. Ghebremedhin, K. Del Tredici, E. Braak, H. Braak, *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2000**, *59*, 733-748.
- [12] R. Perneczky, P. Alexopoulos, G. Schmid, C. Sorg, H. Förstl, J. Diehl-Schmid, A. Kurz, *Der Nervenarzt* **2011**, *82*, 325-335.
- [13] G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, D. J. Selkoe, *Nature medicine* **2008**, *14*, 837-842.
- [14] L. Bertram, R. E. Tanzi, *The Journal of clinical investigation* **2005**, *115*, 1449-1457.
- [15] S. A. Small, S. Gandy, *Neuron* **2006**, *52*, 15-31.
- [16] F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 499-509.
- [17] S. F. Lichtenthaler, C. Haass, *The Journal of clinical investigation* **2004**, *113*, 1384-1387.
- [18] G. Thinakaran, E. H. Koo, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29615-29619.
- [19] D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Neuron* **2004**, *44*, 181-193.
- [20] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science (Washington, DC, United States)* **2002**, *297*, 353-356.
- [21] H. F. Kung, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *3*, 265-267.
- [22] J. A. Hardy, G. A. Higgins, *Science (New York, N.Y.)* **1992**, *256*, 184-185.
- [23] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, *48*, 3030-3059.
- [24] Y.-D. Huang, *Curr. Opin. Lipidol.* **2010**, *21*, 337-345.
- [25] P. B. Verghese, J. M. Castellano, D. M. Holtzman, *The Lancet Neurology* **2011**, *10*, 241-252.
- [26] L. Gravitz, *Nature (London, United Kingdom)* **2011**, *475*, S9-S11.
- [27] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 101-112.
- [28] D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *J Neurochem* **2007**, *101*, 1172-1184.
- [29] D. Jiang, L. Men, J. Wang, Y. Zhang, S. Chickenyen, Y. Wang, F. Zhou, *Biochemistry* **2007**, *46*, 9270-9282.
- [30] P. J. Crouch, A. R. White, A. I. Bush, *FEBS Journal* **2007**, *274*, 3775-3783.
- [31] M. Yaar, S. Zhai, R. E. Fine, P. B. Eisenhauer, B. L. Arble, K. B. Stewart, B. A. Gilchrest, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7720-7725.
- [32] J. Bieschke, Q. Zhang, E. T. Powers, R. A. Lerner, J. W. Kelly, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4977-4983.
- [33] B. J. Blanchard, V. L. Thomas, V. M. Ingram, *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, *293*, 1197-1203.
- [34] B. L. Kelly, A. Ferreira, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28079-28089.
- [35] K. Jellinger, *Acta neuropathologica* **2009**, *118*, 1-3.
- [36] R. A. Nixon, J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo, A. M. Cuervo, *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2005**, *64*, 113-122.

- [37] W. H. Yu, A. M. Cuervo, A. Kumar, C. M. Peterhoff, S. D. Schmidt, J.-H. Lee, P. S. Mohan, M. Mercken, M. R. Farmery, L. O. Tjernberg, Y. Jiang, K. Duff, Y. Uchiyama, J. Naslund, P. M. Mathews, A. M. Cataldo, R. A. Nixon, *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 87-98.
- [38] A. Schneider, E. Mandelkow, *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 443-457.
- [39] G. Alvarez, J. R. Muñoz-Montaña, J. Satrustegui, J. Avila, E. Bogónez, J. Díaz-Nido, *Bipolar Disorders* **2002**, *4*, 153-165.
- [40] C. Dumontet, M. A. Jordan, *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 790-803.
- [41] M. Goedert, M. G. Spillantini, N. J. Cairns, R. A. Crowther, *Neuron* **1992**, *8*, 159-168.
- [42] D. P. Hanger, B. H. Anderton, W. Noble, *Trends in Molecular Medicine* **2009**, *15*, 112-119.
- [43] R. Medeiros, D. Baglietto-Vargas, F. M. LaFerla, *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2011**, *17*, 514-524.
- [44] C. Ballatore, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 663-672.
- [45] E. Planel, X. Sun, A. Takashima, *Drug Development Research* **2002**, *56*, 491-510.
- [46] A. Mudher, S. Lovestone, *Trends in Neurosciences* **2002**, *25*, 22-26.
- [47] K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 783-793.
- [48] M. P. Mazanetz, P. M. Fischer, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 464-479.
- [49] J. R. Woodgett, *Seminars in cancer biology* **1994**, *5*, 269-275.
- [50] M. A. Mines, E. Beurel, R. S. Jope, *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2011**, 861072, 861011 pp.
- [51] H. E. ter, J. T. Coll, D. A. Austen, H.-M. Hsiao, L. Swenson, J. Jain, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 593-596.
- [52] P. Cohen, S. Frame, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 769-776.
- [53] S. F. C. Mulot, K. Hughes, J. R. Woodgett, B. H. Anderton, D. P. Hanger, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 359-364.
- [54] E. M. Mandelkow, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, L. J. Van, J. R. Vandenheede, E. Mandelkow, *FEBS Lett.* **1992**, *314*, 315-321.
- [55] S. Lovestone, C. H. Reynolds, D. Latimer, D. R. Davis, B. H. Anderton, J.-M. Gallo, D. Hanger, S. Mulot, B. Marquardt, a. et, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 1077-1086.
- [56] B. R. Sperber, S. Leight, M. Goedert, V. M. Y. Lee, *Neurosci. Lett.* **1995**, *197*, 149-153.
- [57] H. F. Dovey, V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztynska, K. L. Hu, K. L. Johnson-Wood, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. A. Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. C. Clemens, D. L. Czilli, D. K. Dieckman-McGinty, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. A. Hyslop, E. M. Johnstone, W. Y. Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, J. E. Audia, *J Neurochem* **2001**, *76*, 173-181.
- [58] A. L. Parks, D. Curtis, *Trends in genetics : TIG* **2007**, *23*, 140-150.
- [59] G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins, E. M. Parker, *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 12876-12882.
- [60] J. Milano, J. McKay, C. Dagenais, L. Foster-Brown, F. Pognan, R. Gadiant, R. T. Jacobs, A. Zacco, B. Greenberg, P. J. Ciaccio, *Toxicol. Sci.* **2004**, *82*, 341-358.
- [61] P. L. McGeer, E. G. McGeer, *Neurobiol Aging* **2007**, *28*, 639-647.
- [62] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
- [63] D. M. Barten, V. L. Guss, J. A. Corsa, A. Loo, S. B. Hansel, M. Zheng, B. Munoz, K. Srinivasan, B. Wang, B. J. Robertson, C. T. Polson, J. Wang, S. B. Roberts, J. P. Hendrick, J. J. Anderson, J. K. Loy, R. Denton, T. A. Verdoorn, D. W. Smith, K. M. Felsenstein, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2005**, *312*, 635-643.
- [64] M. Citron, *Trends in pharmacological sciences* **2004**, *25*, 92-97.
- [65] S. L. Cole, R. Vassar, *Molecular neurodegeneration* **2007**, *2*, 22.
- [66] R. M. Nitsch, B. E. Slack, R. J. Wurtman, J. H. Growdon, *Science (New York, N.Y.)* **1992**, *258*, 304-307.
- [67] C. Hock, A. Maddalena, A. Raschig, F. Muller-Spahn, G. Eschweiler, K. Hager, I. Heuser, H. Hampel, T. Muller-Thomsen, W. Oertel, M. Wienrich, A. Signorell, C. Gonzalez-Agosti, R.

- M. Nitsch, *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* **2003**, 10, 1-6.
- [68] M. Townsend, J. P. Cleary, T. Mehta, J. Hofmeister, S. Lesne, E. O'Hare, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Annals of Neurology* **2006**, 60, 668-676.
- [69] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, 30, 665-676.
- [70] C. A. Hawkes, J. McLaurin, *Expert review of neurotherapeutics* **2007**, 7, 1535-1548.
- [71] D. Schenk, M. Hagen, P. Seubert, *Current opinion in immunology* **2004**, 16, 599-606.
- [72] B. Borroni, C. Agosti, E. Magnani, L. M. Di, A. Padovani, *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18, 2655-2660.
- [73] S. M. Laws, P. Friedrich, J. Diehl-Schmid, J. Müller, B. Ibach, J. Bäuml, T. Eisele, H. Förstl, A. Kurz, M. Riemenschneider, *Neurobiology of Aging* **2008**, 29, 1276-1278.
- [74] S. Mondragón-Rodríguez, G. Perry, X. Zhu, J. Boehm, *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 2012.
- [75] B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt, E.-M. Mandelkow, H. Waldmann, E. Mandelkow, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, 1740-1752.
- [76] C. Wischik, Benthams, P., Wischik, D. & Seng, K, *Alzheimers Dement.* **2008**, 4 (Suppl. 1).
- [77] L. Meijer, M. Flajolet, P. Greengard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 471-480.
- [78] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormoe, Y. Nilsson, A.-C. Radesaeter, E. Jerning, P.-O. Markgren, T. Borgegard, M. Nyloef, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Diaz-Nido, J. Avila, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45937-45945.
- [79] J. M. Dominguez, A. Fuertes, L. Orozco, M.-M. M. del, E. Delgado, M. Medina, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 893-904.
- [80] A. Boutajangout, E. M. Sigurdsson, P. K. Krishnamurthy, *Curr. Alzheimer Res.* **2011**, 8, 666-677.
- [81] E. J. Davidowitz, J. G. Moe, Oligomerix, Inc, USA . **2012**, p. 63pp.
- [82] J. Mitchell, R. Arnold, K. Dawson, P. Nestor, J. Hodges, *Journal of Neurology* **2009**, 256, 1500-1509.
- [83] H. Quigley, S. J. Colloby, J. T. O'Brien, *International Journal of Geriatric Psychiatry* **2011**, 26, 991-999.
- [84] R. C. Petersen, R. O. Roberts, D. S. Knopman, B. F. Boeve, Y. E. Geda, R. J. Ivnik, G. E. Smith, C. R. Jack, Jr., *Arch Neurol* **2009**, 66, 1447-1455.
- [85] S. Basu, T. C. Kwee, S. Surti, E. A. Akin, D. Yoo, A. Alavi, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, 1228, 1-18.
- [86] D. S. Karow, L. K. McEvoy, C. Fennema-Notestine, D. J. Hagler, R. G. Jennings, J. B. Brewer, C. K. Hoh, A. M. Dale, f. t. A. s. D. N. Initiative, *Radiology* **2010**, 256, 932-942.
- [87] M. L. Schroeter, T. Stein, N. Maslowski, J. Neumann, *NeuroImage* **2009**, 47, 1196-1206.
- [88] M. Sjöbeck, M. Haglund, E. Englund, *International Journal of Geriatric Psychiatry* **2005**, 20, 919-926.
- [89] K. Herholz, E. Salmon, D. Perani, J. C. Baron, V. Holthoff, L. Frölich, P. Schönknecht, K. Ito, R. Mielke, E. Kalbe, G. Zündorf, X. Delbeuck, O. Pelati, D. Anchisi, F. Fazio, N. Kerrouche, B. Desgranges, F. Eustache, B. Beuthien-Baumann, C. Menzel, J. Schröder, T. Kato, Y. Arahata, M. Henze, W. D. Heiss, *NeuroImage* **2002**, 17, 302-316.
- [90] W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G.-F. Huang, S. Estrada, B. Ausén, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, B. Långström, *Annals of Neurology* **2004**, 55, 306-319.
- [91] C. M. Clark, J. A. Schneider, B. J. Bedell, T. G. Beach, W. B. Bilker, M. A. Mintun, M. J. Pontecorvo, F. Hefti, A. P. Carpenter, M. L. Flitter, M. J. Krautkramer, H. F. Kung, R. E. Coleman, P. M. Doraiswamy, A. S. Fleisher, M. N. Sabbagh, C. H. Sadowsky, E. M. Reiman, S. P. Zehntner, D. M. Skovronsky, f. t. Av45-A07 Study Group, *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **2011**, 305, 275-283.

-
- [92] H. Engler, A. Forsberg, O. Almkvist, G. Blomqvist, E. Larsson, I. Savitcheva, A. Wall, A. Ringheim, B. Långström, A. Nordberg, *Brain : a journal of neurology* **2006**, *129*, 2856-2866.
- [93] M. Ono, S. Hayashi, K. Matsumura, H. Kimura, Y. Okamoto, M. Ihara, R. Takahashi, H. Mori, H. Saji, *ACS Chemical Neuroscience* **2011**, *2*, 269-275.
- [94] T. Fodero-Tavoletti Michelle, N. Okamura, S. Furumoto, S. Mulligan Rachel, R. Connor Andrea, A. McLean Catriona, D. Cao, A. Rigopoulos, A. Cartwright Glenn, G. O'Keefe, S. Gong, A. Adlard Paul, J. Barnham Kevin, C. Rowe Christopher, L. Masters Colin, Y. Kudo, R. Cappai, K. Yanai, L. Villemagne Victor, *Brain : a journal of neurology* **2011**, *134*, 1089-1100.
- [95] A. Nordberg, J. O. Rinne, A. Kadir, B. Langstrom, *Nat Rev Neurol* **2010**, *6*, 78-87.
- [96] W. Van Paesschen, P. Dupont, S. Sunaert, K. Goffin, K. Van Laere, *Current opinion in neurology* **2007**, *20*, 194-202.
- [97] D. H. S. Silverman, *J Nucl Med* **2004**, *45*, 594-607.
- [98] H. J. Aizenstein, R. D. Nebes, J. A. Saxton, J. C. Price, C. A. Mathis, N. D. Tsopelas, S. K. Ziolko, J. A. James, B. E. Snitz, P. R. Houck, W. Bi, A. D. Cohen, B. J. Lopresti, S. T. DeKosky, E. M. Halligan, W. E. Klunk, *Arch Neurol* **2008**, *65*, 1509-1517.
- [99] M. Ewers, R. A. Sperling, W. E. Klunk, M. W. Weiner, H. Hampel, *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 430-442.
- [100] T. Grimmer, S. Tholen, B. H. Yousefi, P. Alexopoulos, A. Förchler, H. Förstl, G. Henriksen, W. E. Klunk, C. A. Mathis, R. Perneczky, C. Sorg, A. Kurz, A. Drzezga, *Biological Psychiatry* **2010**, *68*, 879-884.
- [101] C. R. Jack, V. J. Lowe, S. D. Weigand, H. J. Wiste, M. L. Senjem, D. S. Knopman, M. M. Shiung, J. L. Gunter, B. F. Boeve, B. J. Kemp, M. Weiner, R. C. Petersen, t. A. s. D. N. Initiative, *Brain : a journal of neurology* **2009**, *132*, 1355-1365.
- [102] A. Kadir, O. Almkvist, A. Forsberg, A. Wall, H. Engler, B. Långström, A. Nordberg, *Neurobiology of Aging* **2012**, *33*, 198.e191-198.e114.
- [103] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48*, 3244-3266.
- [104] P. Didier, A. Jouonang, Y. Mely, *Spectra Anal.* **2010**, *39*, 59-63.
- [105] B. R. Masters, P. T. C. So, *Microscopy Research and Technique* **2004**, *63*, 3-11.
- [106] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *248*, 73-76.
- [107] S. Yao, K. D. Belfield, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3199-3217.
- [108] C. D. Geddes, J. R. Lakowicz, C. J. Fahrni, *Vol. 2007*, Springer New York, **2009**, pp. 249-269.
- [109] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [110] W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G.-f. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, B. Langstrom, *Annals of Neurology* **2004**, *55*, 306-319.
- [111] W. E. Klunk, B. J. Bacskai, C. A. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang, B. T. Hyman, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2002**, *61*, 797-805.
- [112] T. Misgeld, M. Kerschensteiner, *Nat Rev Neurosci* **2006**, *7*, 449-463.
- [113] S. Burgold, T. Bittner, M. Dorostkar Mario, D. Kieser, M. Fuhrmann, G. Mitteregger, H. Kretschmar, B. Schmidt, J. Herms, *Acta neuropathologica* **2011**, *121*, 327-335.
- [114] R. S. Wilson, J. A. Schneider, S. E. Arnold, Y. Tang, P. A. Boyle, D. A. Bennett, *Arch Gen Psychiatry* **2007**, *64*, 802-808.
- [115] D. P. Devanand, K. S. Michaels-Marston, X. H. Liu, G. H. Pelton, M. Padilla, K. Marder, K. Bell, Y. Stern, R. Mayeux, *Am. J. Psychiat.* **2000**, *157*, 1399-1405.
- [116] C. Murphy, M. M. Gilmore, C. S. Seery, D. P. Salmon, B. R. Lasker, *Neurobiology of Aging* **1990**, *11*, 465-469.
- [117] R. S. Wilson, S. E. Arnold, J. A. Schneider, Y. Tang, D. A. Bennett, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2007**, *78*, 30-35.
- [118] A. Muller, H. Reichmann, A. Livermore, T. Hummel, *J. Neural Transm.* **2002**, *109*, 805-811.
- [119] P. J. Moberg, R. L. Doty, *Int. J. Neurosci.* **1997**, *89*, 133-139.
-

-
- [120] R. L. Doty, L. I. Golbe, D. A. McKeown, M. B. Stern, C. M. Lehrach, D. Crawford, *Neurology* **1993**, *43*, 962-965.
- [121] S. E. Arnold, B. T. Hyman, J. Flory, A. R. Damasio, G. W. Van Hoesen, *Cereb. Cortex* **1991**, *1*, 103-116.
- [122] L. Silveira-Moriyama, J. L. Holton, A. Kingsbury, H. Ayling, A. Petrie, W. Sterlacci, W. Poewe, H. Maier, A. J. Lees, T. Revesz, *Neuroscience Letters* **2009**, *453*, 77-80.
- [123] R. L. Doty, D. P. Perl, J. C. Steele, K. M. Chen, J. D. Pierce, Jr., P. Reyes, L. T. Kurland, *Geriatrics* **1991**, *46 Suppl 1*, 47-51.
- [124] B. R. Talamo, R. A. Rudel, K. S. Kosik, V. M. Y. Lee, S. Neff, L. Adelman, J. S. Kauer, *Nature* **1989**, *337*, 736-739.
- [125] M. Tabaton, S. Cammarata, G. L. Mancardi, G. Cordone, G. Perry, C. Loeb, *Neurology* **1991**, *41*, 391-394.
- [126] J. E. Duda, U. Shah, S. E. Arnold, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Exp. Neurol.* **1999**, *160*, 515-522.
- [127] P. B. Crino, J. A. Martin, W. D. Hill, B. Greenberg, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **1995**, *104*, 655-661.
- [128] S. E. Arnold, E. B. Lee, P. J. Moberg, L. Stutzbach, H. Kazi, L.-Y. Han, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Annals of Neurology* **2010**, *67*, 462-469.
- [129] D. A. Bennett, J. A. Schneider, Z. Arvanitakis, J. F. Kelly, N. T. Aggarwal, R. C. Shah, R. S. Wilson, *Neurology* **2006**, *66*, 1837-1844.
- [130] L. Cabrejo, L. Guyant-Marechal, A. Laquerriere, M. Vercelletto, F. De la Fourniere, C. Thomas-Anterion, C. Verny, F. Letournel, F. Pasquier, A. Vital, F. Checler, T. Frebourg, D. Campion, D. Hannequin, *Brain : a journal of neurology* **2006**, *129*, 2966-2976.
- [131] C. Mori, E. T. Spooner, K. E. Wisniewski, T. M. Wisniewski, H. Yamaguchi, T. C. Saido, D. R. Toland, D. J. Selkoe, C. A. Lemere, *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* **2002**, *9*, 88-102.
- [132] M. Knobloch, U. Konietzko, D. C. Krebs, R. M. Nitsch, *Neurobiology of Aging* **2007**, *28*, 1297-1306.
- [133] S. Oddo, A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng, F. M. LaFerla, *Neurobiology of Aging* **2003**, *24*, 1063-1070.
- [134] L. B. Haberly, *Chem. Senses* **2001**, *26*, 551-576.
- [135] J. D. Howard, J. Plailly, M. Grueschow, J. D. Haynes, J. A. Gottfried, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 932-U158.
- [136] A. U. Bayer, F. Ferrari, C. Erb, *European neurology* **2002**, *47*, 165-168.
- [137] L. Guo, J. Duggan, M. F. Cordeiro, *Current Alzheimer research* **2010**, *7*, 3-14.
- [138] J. C. Blanks, Y. Torigoe, D. R. Hinton, R. H. Blanks, *Neurobiol Aging* **1996**, *17*, 377-384.
- [139] H. Tamura, H. Kawakami, T. Kanamoto, T. Kato, T. Yokoyama, K. Sasaki, Y. Izumi, M. Matsumoto, H. K. Mishima, *Journal of the neurological sciences* **2006**, *246*, 79-83.
- [140] K. Chiu, T.-F. Chan, A. Wu, I. Leung, K.-F. So, R. Chang, *AGE* **2012**, *34*, 633-649.
- [141] H. Wassele, *Nat Rev Neurosci* **2004**, *5*, 747-757.
- [142] M. F. Mendez, M. A. Mendez, R. Martin, K. A. Smyth, P. J. Whitehouse, *Neurology* **1990**, *40*, 439-443.
- [143] T. R. Hedges, 3rd, R. Perez Galves, D. Speigelman, N. R. Barbas, E. Peli, C. J. Yardley, *Acta ophthalmologica Scandinavica* **1996**, *74*, 271-275.
- [144] G. W. Arendash, J. Lewis, R. E. Leighty, E. McGowan, J. R. Cracchiolo, M. Hutton, M. F. Garcia, *Brain Res* **2004**, *1012*, 29-41.
- [145] A. Ning, J. Cui, E. To, K. H. Ashe, J. Matsubara, *Investigative ophthalmology & visual science* **2008**, *49*, 5136-5143.
- [146] R. Dutescu, Q.-X. Li, J. Crowston, C. Masters, P. Baird, J. Culvenor, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **2009**, *247*, 1213-1221.
- [147] B. Liu, S. Rasool, Z. Yang, C. G. Glabe, S. S. Schreiber, J. Ge, Z. Tan, *The American journal of pathology* **2009**, *175*, 2099-2110.
- [148] P. Wostyn, K. Audenaert, P. P. De Deyn, *Clinical neurology and neurosurgery* **2008**, *110*, 101-109.
- [149] D. Muyliaert, A. Kremer, T. Jaworski, P. Borghgraef, H. Devijver, S. Croes, I. Dewachter, F. Van Leuven, *Genes, brain, and behavior* **2008**, *7 Suppl 1*, 57-66.

-
- [150] J. D. Ding, J. Lin, B. E. Mace, R. Herrmann, P. Sullivan, C. Bowes Rickman, *Vision research* **2008**, *48*, 339-345.
- [151] M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V. Ljubimov, C. A. Miller, M. K. Ko, K. L. Black, M. Schwartz, D. L. Farkas, *NeuroImage* **2011**, *54*, Supplement 1, S204-S217.
- [152] L. Baum, C. W. Lam, S. K. Cheung, T. Kwok, V. Lui, J. Tsoh, L. Lam, V. Leung, E. Hui, C. Ng, J. Woo, H. F. Chiu, W. B. Goggins, B. C. Zee, K. F. Cheng, C. Y. Fong, A. Wong, H. Mok, M. S. Chow, P. C. Ho, S. P. Ip, C. S. Ho, X. W. Yu, C. Y. Lai, M. H. Chan, S. Szeto, I. H. Chan, V. Mok, *Journal of clinical psychopharmacology* **2008**, *28*, 110-113.
- [153] T. Esatbeyoglu, P. Huebbe, I. M. A. Ernst, D. Chin, A. E. Wagner, G. Rimbach, *Angewandte Chemie* **2012**, *124*, 5402-5427.
- [154] N. Gupta, J. Fong, L. C. Ang, Y. H. Yucel, *Can J Ophthalmol* **2008**, *43*, 53-60.
- [155] I. Greeve, D. Kretzschmar, J.-A. Tschaepe, A. Beyn, C. Brellinger, M. Schweizer, R. M. Nitsch, R. Reifegerste, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 3899-3906.
- [156] G. R. Jackson, M. Wiedau-Pazos, T.-K. Sang, N. Wagle, C. A. Brown, S. Massachi, D. H. Geschwind, *Neuron* **2002**, *34*, 509-519.
- [157] L. Gasparini, R. Anthony Crowther, K. R. Martin, N. Berg, M. Coleman, M. Goedert, M. G. Spillantini, *Neurobiology of Aging* **2011**, *32*, 419-433.
- [158] R. Narlawar, M. Pickhardt, S. Leuchtenberger, K. Baumann, S. Krause, T. Dyrks, S. Weggen, E. Mandelkow, B. Schmidt, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 165-172.
- [159] M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E.-M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10016-10023.
- [160] T. Uchihara, A. Nakamura, M. Yamazaki, O. Mori, K. Ikeda, K. Tsuchiya, *Acta Neuropathol.* **2001**, *102*, 462-466.
- [161] M.-P. Kung, C. Hou, Z.-P. Zhuang, D. Skovronsky, H. F. Kung, *Brain Research* **2004**, *1025*, 98-105.
- [162] T. T. Solbu, T. Holen, *Chem. Senses* **2012**, *37*, 35-46.
- [163] W. Dzwolak, M. Pecul, *FEBS Letters* **2005**, *579*, 6601-6603.
- [164] M. Landau, M. R. Sawaya, K. F. Faull, A. Laganowsky, L. Jiang, S. A. Sievers, J. Liu, J. R. Barrio, D. Eisenberg, *PLoS Biology* **2011**, *9*, e1001080.
- [165] M. Kalkanidis, N. Klonis, L. Tilley, L. W. Deady, *Biochemical Pharmacology* **2002**, *63*, 833-842.

7. Anhang

Alexander Boländer
Draustraße 30
64347 Griesheim

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

[Alexander Boländer]

25.06.2012

Alexander Boländer

Draustraße 30

64347 Griesheim

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

[Alexander Boländer]

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexander Boländer

Geburtsdatum / -ort: 22.12.1981, Darmstadt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand ledig

Ausbildung

01/2008-08/2012 Technische Universität Darmstadt, Promotion bei Prof. Dr. B. Schmidt zum Thema „Synthese und Evaluation fluoreszenter Sonden für nichtinvasive Diagnoseverfahren der Alzheimer-Demenz“

04/2007-09/2007 Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit bei Prof. Dr. M. Reggelin zum Thema „Studien zur funktionalisierenden Desulfurierung von Sulfoximin“

10/2001-09/2007 Technische Universität Darmstadt, Diplomstudium Chemie, Abschluss: Diplom-Ingenieur (Chemie)

Schulbildung

08/1992-05/2001 Edith-Stein-Schule Darmstadt, staatlich anerkanntes katholisches Gymnasium, Abschluss: Abitur

08/1988-07/1992 Carlo-Mierendorff-Grundschule, Griesheim

Griesheim, 25.06.2012

